

# ANNALES

## DE

# L'INSTITUT PASTEUR

### MISE EN ÉVIDENCE MYCOLOGIQUE DU SACCHAROSE, GLUCIDE NON RÉDUCTEUR

UN CHAMPIGNON (*CANDIDA TROPICALIS* CAST.) QUI PEUT ÊTRE CONSIDÉRÉ  
COMME SPÉCIFIQUE POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DE CE SUCRE  
PARMI LES SUBSTANCES NON RÉDUCTRICES

(Avec un addendum sur l'identification mycologique de l'inuline).

par Aldo CASTELLANI (\*).

(*Institut de Médecine Tropicale de Lisbonne*)

Il y a bien longtemps, en 1917, j'ai décrit dans le *British medical Journal* (29 décembre), avec la collaboration du D<sup>r</sup> Frank E. Taylor, une série de méthodes microbiologiques pour la recherche et l'identification d'un assez grand nombre de sucres et autres glucides Fehling-réducteurs ou non Fehling-réducteurs. Jusqu'à cette époque, le glucose était la seule substance pour l'identification de laquelle on employait une méthode mycologique : la fermentation par la levure de boulanger (levure de bière) était considérée comme spécifique pour ce sucre. Il est intéressant de noter que cette opinion, bien qu'erronée, se trouve encore dans plusieurs ouvrages modernes de biochimie médicale. La levure de boulanger, en effet, fait fermenter non seulement le glucose, mais encore constamment le lévulose et le mannose,

(\*) Manuscrit reçu le 15 octobre 1958.

presque constamment le maltose, souvent le galactose et le saccharose, et occasionnellement le lactose.

Récemment, un biochimiste bien connu m'a conseillé de reprendre l'étude du sujet dans le but de rendre moins laborieuses et plus pratiques mes anciennes méthodes.

S'il est vrai que la chromatographie, si simple, a rendu inutiles beaucoup de mes anciens procédés, il ne faut pas oublier cependant que, comme l'a écrit si justement Anne-Marie Staub, l'identification définitive d'un sucre ne peut pas se faire sur la seule valeur d'un  $R_F$ , ou par l'utilisation des révélateurs.

Dans la présente note, je me limiterai à traiter brièvement de la détermination mycologique du saccharose, glucide non réducteur. J'emploie le terme mycologique *sensu lato* pour indiquer non seulement l'emploi des champignons, mais encore celui des bactéries.

#### MÉTHODE RECOMMANDÉE.

La méthode la plus simple et la plus pratique est la suivante (il s'agit en réalité d'une méthode chimico-mycologique) :

La substance à déterminer, en solution, est éprouvée avec le Fehling ou le Benedict. Si la réaction est positive, la substance ne peut pas être du saccharose puisque ce sucre est non réducteur, et il est alors inutile de continuer l'investigation. Si la substance est non réductrice, on en prépare une solution à 1 p. 100 dans de l'eau peptonée comme on en trouve dans tous les laboratoires de bactériologie (n'employer jamais du bouillon de viande qui peut contenir des traces de glucose). La solution, après stérilisation (une ébullition d'une demi-minute est suffisante en pratique et n'altère pas la structure des glucides usuels) est placée dans un saccharimètre stérilisé ou dans un simple tube de verre stérile, contenant de préférence un petit tube de Durham pour capter le gaz. On ensemence avec *Candida tropicalis*, et le saccharimètre, ou le tube, est placé à l'étuve à 35°-37° C. S'il y a fermentation, on peut conclure que la substance est très probablement du saccharose. Pourquoi ? L'explication se lit facilement sur le tableau des propriétés fermentaires des champignons et bactéries employés dans mes méthodes.

Parmi les très nombreuses substances étudiées : glucides, alcools, etc. (les substances mentionnées sur le tableau ne représentent qu'une fraction d'entre elles), seuls le glucose, le lévulose, le mannose, le maltose, le galactose, le saccharose fermentent avec formation de gaz sous l'influence de *C. tropicalis* souche A. Une substance ayant été fermentée par ce champignon doit donc être ou du glucose, ou du lévulose, ou du mannose, ou du maltose, ou du galactose ou du saccharose. Mais si elle avait été

TABLEAU I. — Action fermentaire sur les glucides et autres substances de quelques champignons et bactéries.

	Glucose	Lévulose	Mannose	Maltose	Galactose	Lactose	Arabinose	Rhamnose	Xylose	Saccharose	Inuline	Raffinose	Adonitol	Dulcitol	Mannitol	Sorbitol	Salicine	Amygdaline	Inositol	Créatinine	Ac. urique	Glycérates	Ac. salicylurique	Ac. homogénitissique
<i>Candida krusei</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (Robin)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
var. <i>pinoyi</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (Robin)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
var. <i>metatandiniensis</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida pseudotropicalis</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida macedoniensis</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida guilliermondi</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus morgani</i> (Cast. & Chalm.) (Souche A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella schottmuelleri</i> (Winslow & al.) (Souche M)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> (Migula)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
var. <i>communis</i> (Auctores) (Souche C)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> (Migula)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
var. <i>communior</i> (Auctores) (Souche Q)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Fermentation avec production de gaz. 0 = Absence de fermentation (il n'est tenu aucun compte d'une simple acidité).



du glucose, du lévulose, du mannose, du maltose, du galactose, elle aurait réduit le Fehling et le Benedict. Il ne reste pratiquement qu'une seule possibilité : il s'agit de saccharose. Ce raisonnement peut être résumé par la formule mycologique, ou plus exactement chimico-mycologique, suivante :

Saccharose :

Fehling, Benedict .....	0
<i>Candida tropicalis</i> .....	+

En employant des saccharimètres gradués, on peut développer des méthodes quantitatives.

#### MÉTHODE STRICTEMENT MYCOLOGIQUE.

La méthode que j'ai recommandée est en réalité une méthode chimico-mycologique. S'il l'on désire avoir recours à des méthodes mycologiques *sensu stricto* il y en a plusieurs. J'en mentionnerai deux.

1° Une solution à 1 p. 100 de la substance à déterminer est préparée en eau peptonée et après stérilisation (ébullition d'une demi-minute) est distribuée en deux saccharimètres, ou deux tubes, contenant chacun un petit tube de Durham. Le saccharimètre ou le tube n° 1 est ensemencé avec *Candida tropicalis*, et le saccharimètre ou le tube n° 2 avec *Salmonella schottmuelleri*. On les place à l'étuve à 35-37° C. S'il y a fermentation avec *C. tropicalis* et pas de fermentation avec *S. schottmuelleri*, on peut conclure que selon toute probabilité, il s'agit de saccharose. On en trouve l'explication sur le tableau des fermentations.

*Candida tropicalis* produit une fermentation gazeuse seulement dans le glucose, le lévulose, le mannose, le maltose, le galactose, le saccharose. Notre substance ayant été fermentée par ce champignon doit donc être l'un de ces six glucides. Mais si elle était du glucose, du lévulose, du mannose, du maltose ou du galactose, elle aurait été fermentée aussi par *S. schottmuelleri*. Il reste donc une seule possibilité : ce doit être du saccharose.

Saccharose :

<i>Candida tropicalis</i> .....	+
<i>Salmonella schottmuelleri</i> .....	0

2° Une portion de la solution de la substance est ensemencée avec *Escherichia coli* var. *communior* (souche Q) et une autre portion avec *Escherichia coli* var. *communis* (souche C). S'il y a fermentation avec *communior* et non avec *communis*, il s'agit de saccharose. La raison en est que les deux souches attaquent

les mêmes substances à l'exception du saccharose, qui est fermenté par *communior* (souche Q) et non par *communis* (souche C).

Saccharose :

<i>Escherichia coli communior</i> (souche Q) .....	+
<i>Escherichia coli communis</i> (souche C) .....	0

RECHERCHE ET IDENTIFICATION DU SACCHAROSE DANS UN MÉLANGE  
CONTENANT UN OU PLUSIEURS SUCRES RÉDUCTEURS SUIVANTS :  
GLUCOSE, LÉVULOSE, MANNOSE, MALTOSE, GALACTOSE.

La solution du mélange (elle est Fehling et Benedict positive) est inoculée avec *Escherichia coli communis* (souche C), qui ne touche pas le saccharose tandis qu'elle fermente les sucres réducteurs mentionnés (et de nombreuses autres substances). Si après épuisement complet par cette souche le liquide est fermentescible par *Candida tropicalis*, on peut conclure que le mélange contenait du saccharose.

*Explication.* — Le liquide ayant été épuisé complètement par *Escherichia coli* var. *communis* ne contiendra plus aucun des sucres réducteur mentionnés, et il sera Fehling et Benedict négatif. Si ce liquide est capable d'être fermenté par *Candida tropicalis*, cela indique la présence de saccharose puisque, en pratique, le saccharose est la seule substance fermentescible par *Candida tropicalis* à part le glucose, lévulose, mannose, maltose, galactose (voir tableau des fermentations).

### CONCLUSION.

Le saccharose peut être facilement déterminé par des méthodes mycologiques. Le procédé le plus simple, si l'on sait au préalable que la substance à identifier est non réductrice, est l'emploi du champignon *Candida tropicalis* (souche A). En pratique, toute substance non réductrice capable d'être fermentée par *Candida tropicalis* est du saccharose, autrement dit le champignon *Candida tropicalis* est spécifique pour le saccharose, parmi les substances non réductrices.

### SUMMARY

MYCOLOGIC DETECTION AND IDENTIFICATION OF SACCHAROSE,  
A NON-REDUCING GLUCIDE.

A FUNGUS (*Candida tropicalis* CASTELLANI) WHICH CAN BE CONSIDERED  
SPECIFIC FOR THE DETERMINATION OF THIS GLUCIDE  
IF THE SUBSTANCE TO BE DETERMINED IS NON-REDUCING.

Saccharose can easily be identified by means of mycological methods. When the substance to identify is known to be non-reducing, the simplest technique is to use *Candida tropicalis* Cas-

tellani (strain A). Practically, any non-reducing substance which can be fermentated by *Candida tropicalis* is saccharose, or, in other words, *Candida tropicalis* has a specific fermentative activity toward saccharose, among the non-reducing substances.

★ ★

Je serai heureux d'envoyer des cultures de *Candida tropicalis* (souche A) et des autres champignons et bactéries, mentionnés dans le tableau, aux travailleurs de laboratoire qui le désireraient.

### BIBLIOGRAPHIE

CASTELLANI (A.) et TAYLOR (F. E.). *Brit med. J.*, 1917, **2**, 855.

CASTELLANI (A.). *Commentationes Pontificia Academia Scientiarum*, 1955, **47**, 37.

STAUB (A. M.). *Techniques de laboratoire*, p. 792, Masson et Cie, édit. Paris 1954.

### ADDENDUM

#### IDENTIFICATION MYCOLOGIQUE DE L'INULINE.

Il sera peut-être opportun de dire quelques mots sur la détermination mycologique d'une autre substance non réductrice, l'inuline, son emploi dans le « Clearance Test » pour mesurer la filtration glomérulaire ayant provoqué un vif intérêt.

Dans le *Journal of Biochemistry* (1922, **16**, 655-658) j'ai publié, avec le Dr F. E. Taylor, plusieurs méthodes mycologiques et chimico-mycologiques mises au point par moi pour l'identification de cette substance. Récemment, je les ai modifiées et simplifiées. Je me bornerai à décrire brièvement l'une d'elles, strictement mycologique, et la plus simple.

On fait une solution à 1 p. 100 dans de l'eau peptonée de la substance à déterminer et, après stérilisation (ébullition une demi-minute), on la répartit dans deux saccharimètres ou deux tubes stérilisés contenant chacun un petit tube de Durham. Le saccharimètre ou le tube n° 1 estensemencé avec *Candida macedoniensis* (souche A), et le saccharimètre ou tube n° 2, avec *Candida tropicalis* (souche A). On les place à l'étuve à 35°-37°. S'il y a fermentation avec production de gaz avec *C. macedoniensis* et non avec *C. tropicalis*, on peut conclure que, selon toute probabilité, il s'agit de l'inuline. L'explication se lit facilement sur le tableau des fermentations. *C. macedoniensis* provoque la fermentation gazeuse des glucose, lévulose, mannose, galactose, saccharose et inuline seulement. Notre substance ayant été fermentée par ce



champignon doit donc être l'un de ces glucides. Mais si elle était du glucose, du lévulose, du mannose, du galactose ou du saccharose, elle aurait été fermentée aussi par *C. tropicalis*. Il reste une seule possibilité : ce doit être de l'inuline.

Inuline :

<i>Candida macedoniensis</i> .....	+
<i>Candida tropicalis</i> .....	0

*Identification de l'inuline dans un mélange contenant une ou plusieurs des substances suivantes : glucose, lévulose, mannose, maltose, galactose, lactose, arabinose, rhamnose, xylose, saccharose, raffinose, glycérol, dulcitol, mannitol, sorbitol, salicine.* — Le mélange en solution est inoculé, suivant la technique déjà décrite, avec *Escherichia coli* var. *communior* souche Q. Si, après épuisement par cette bactérie, le liquide est encore fermentescible par *C. macedoniensis*, on peut conclure que le mélange contenait de l'inuline. L'explication est donnée par le tableau des fermentations. Naturellement il faut prendre la précaution d'employer des souches d'*E. coli* var. *communior* et de *C. macedoniensis* qui ont à peu près le même pouvoir fermentaire.

*Inulinurie.* — L'inulinurie spontanée n'existe pas, mais quand on fait un « Inulin Clearance Test », l'inuline apparaît dans l'urine. Si l'urine est fermentescible par *C. macedoniensis* et non fermentescible par *C. tropicalis*, ceci indique la présence d'inuline.

*Technique :* 16 cm<sup>3</sup> d'urine sont placés dans un tube ; il est avantageux d'y ajouter 4 à 8 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée pour faciliter le développement des microorganismes. Après ébullition d'une demi-minute on répartit le liquide dans deux saccharimètres ou deux tubes avec petit tube de Durham. Le saccharimètre ou tube n° 1 est ensemencé avec *C. macedoniensis*, le saccharimètre ou tube n° 2, avec *C. tropicalis*. On les place à l'étuve à 35°-37°. S'il se produit une fermentation avec gaz dans le tube n° 1 et pas de fermentation dans le tube n° 2, on peut conclure que, selon toute probabilité, l'urine contenait de l'inuline. En employant des saccharimètres gradués, on peut mettre au point des méthodes quantitatives.

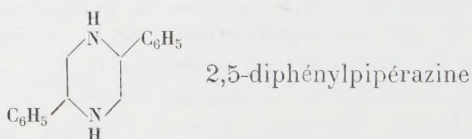
**CONCLUSION.** — En pratique, on peut affirmer que toute substance fermentescible par *C. macedoniensis* et non par *C. tropicalis* est de l'inuline.

# DONNÉES EXPÉRIMENTALES SUR LA PHÉNYRACILLINE ET SON ASSOCIATION AVEC LA DIHYDROSTREPTOMYCINE

par A. LUTZ (\*).

(Laboratoire Départemental de Bactériologie, Strasbourg  
[Directeur : Dr A. LUTZ])

Ce travail expérimental a pour but de rechercher, d'une part, la place du dipénicillinate de 2,5-diphénylpipérazine ou phényracilline



dans le groupe des pénicillines-retard où elle a été rangée par Nominé et ses collaborateurs [1] et, d'autre part, l'intérêt de son association avec la dihydrostreptomycine.

## MÉTHODE EXPÉRIMENTALE.

Nos expériences ont été faites sur des chiens d'une même famille pesant entre 24 et 26 kg. Les titrages des pénicillinémies ont été effectués d'après la méthode de diffusion de Penau et collaborateurs [2]. Les lectures, facilitées par l'utilisation de chlorhydrate de 2-3 triphényl tétrazolium, réactif utilisé par Pratt et Dufrenoy [3] dans l'étude cytochimique de la méthode de Heatley, ont été faites avec un imagiscope.

Pour les dosages de la dihydrostreptomycine nous avons utilisé la méthode des dilutions de Sureau et Chabbert [4], que nous avons modifiée en tenant compte du facteur sérum de chien dans la gamme témoin dans chaque cas. Les taux bactériostatiques de la souche de staphylocoques d'Oxford, utilisée dans nos titrages, ont été recherchés après ensemencements identiques ; ils sont de 0,004 µg/ml pour la pénicilline et 0,15 µg/ml pour la dihydrostreptomycine (lecture faite après dix-huit heures à 37°).

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 novembre 1958.



## RÉSULTATS.

1° Dans une première partie de ce travail nous avons recherché les taux de pénicillémie après injection de phényracilline, comparativement à ceux obtenus après administration de pénicillinate de sodium et de dipénicillinate de N N' dibenzyléthylènediamine ou benzathine pénicilline.

Dans tous les cas ces produits ont été administrés aux chiens par voie intramusculaire à raison de 300 000 unités dans 3 ml de soluté chloruré isotonique à 9 p. 1 000.

Notons que les injections de la phényracilline ont été très bien tolérées.

Voici les pénicillémies observées en U. O. par millilitre de sérum jusqu'à soixante-douze heures après l'injection (tableau I).

TABLEAU I. — Heures de prélèvement après l'injection. Taux en U. Oxford au cours du temps.

Sel injecté		½ H.	1 H.	2 H.	3 H.	4 H.	5 H.	6 H.	8 H.	10 H.	15 H.	24 H.	33 H.	48 H.	72 H.
Sel de sodium		12'	4,75	1,4		0,95		0,31	0,07		indé- soluble				
Sel de 2-5 diphényl/ pipérazine	Chien I		0,96	0,98	0,97		0,71		0,5	0,5	0,36	0,15	0,07	0,03	0,025
	Chien II		0,95	1	1		0,72		0,63	0,4		0,14	0,11	0,08	0,05
	Chien III			0,96	0,82	0,68		0,53	0,44	0,39		0,13		0,05	
	Chien IV		1	1	0,92	0,73		0,6	0,51	0,4	non titré				
Sel de N. N' dibenzyléthyl- ène diamine	I			0,33	0,22	0,22		0,25		0,31	0,31		0,18		0,16
	II			0,26	0,23	0,24		0,26		0,28	0,30		0,14		0,12

Ce tableau met en évidence les faits suivants :

a) L'examen des taux de pénicilline obtenus après injection de quantités égales de pénicillinate de sodium d'une part et de sel 2-5 diphénylpipérazine de la pénicilline G, montre que ce dernier corps représente bien une forme retard ;

b) Cette nouvelle forme retard donne des taux de pénicilline significatifs jusqu'à soixante-douze heures après l'injection.

c) Elle permet de maintenir, pendant les vingt-quatre premières heures après son injection, des concentrations sanguines relativement élevées et en particulier très supérieures à celles obtenues après injection d'une quantité équivalente de pénicilline active, de son sel de N N'-dibenzyléthylène diamine ou benzathine pénicilline.

Les courbes ci-jointes mettent en évidence ces données.

Notons par ailleurs que cette supériorité a été retrouvée également par rapport au pénicillinate de procaïne par Csermely [5], Nominé [1], Marson [6] et Beerens [7] et leurs collaborateurs.

2° Sur l'association : phényracilline-dihydrostreptomycine. — Dans la deuxième partie de ce travail nous avons recherché

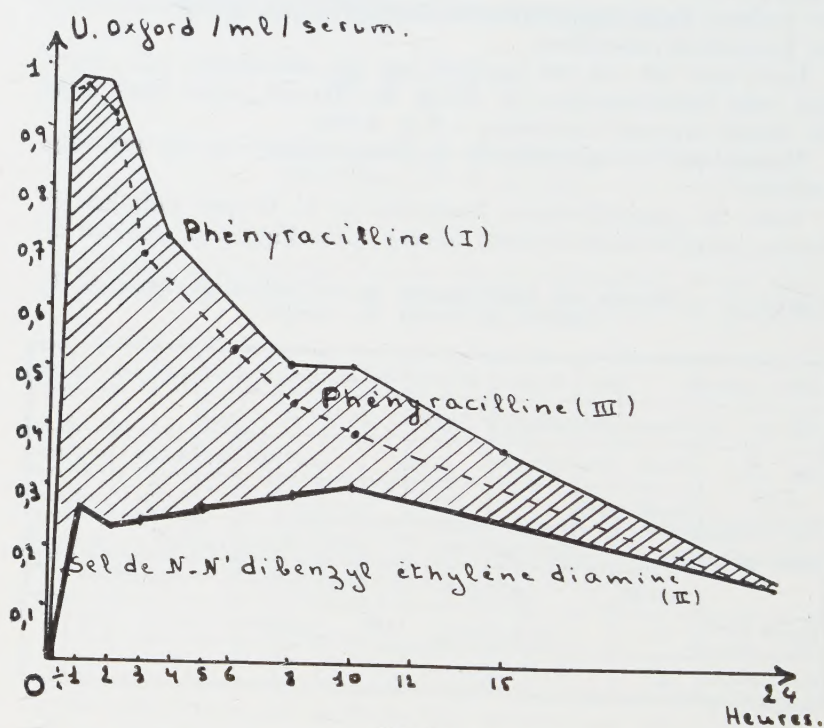


FIG. I.

TABLEAU II.

STREPTOMYCINÉMIES en $\mu\text{g/ml}$ sérum								
	$\frac{1}{2}$ H.	1 H.	2 H.	3 H.	4 H.	6 H.	8 H.	10 H.
Chien I	16,6	16,6	12,1		4,95	1,45	0,88	0,25
Chien II	23,3	16,6	13		6,9	2,5	0,81	0,3
Chien III		16,6	11		6,04	1,8	0,62	0,37
Chien IV		16,6	13	8	4,5	1,04	0,56	0,2

l'action bactéricide de l'association phényracilline-dihydrostreptomycine, par rapport à chacun des constituants envisagés seuls. Avant de rechercher cette action sur le staphylocoque d'Oxford, nous avons injecté à quatre chiens 300 000  $\mu$ g de dihydrostreptomycine par voie intramusculaire, pour connaître les taux de strep-

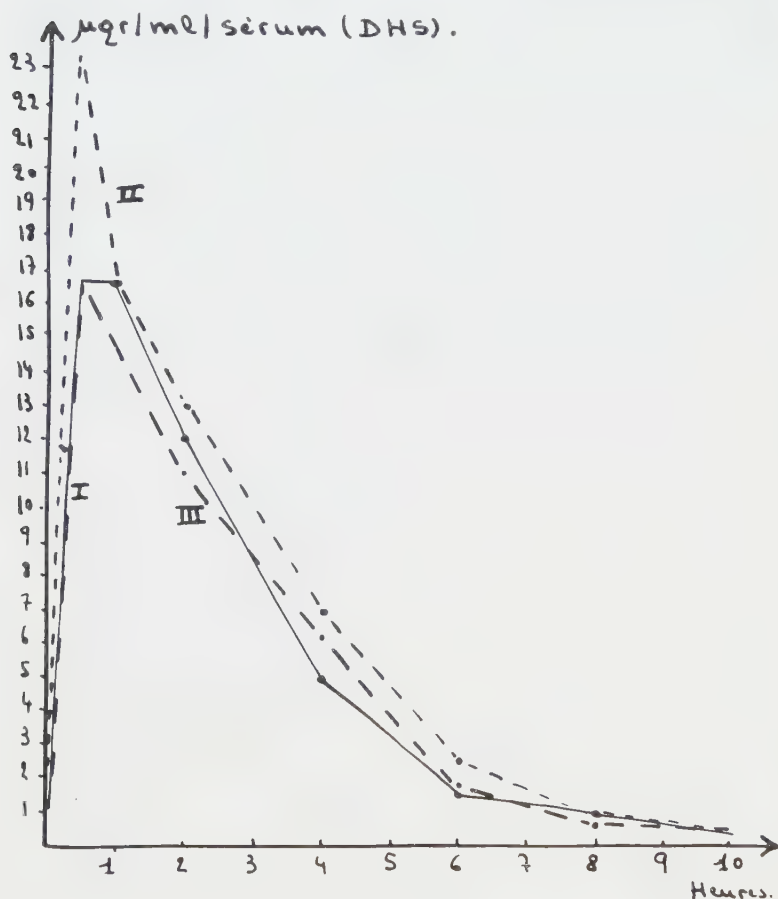


FIG. 2.

tomycinémies associés à ceux de phényracilline dans la recherche du type de synergie.

Le tableau II résume les taux de streptomycinémies observés au cours du temps.

Reproduisons les résultats obtenus sur trois chiens sur un graphique (fig. 2).



Connaissant les taux moyens de phényracilline et de dihydrostreptomycine, nous avons étudié l'action conjuguée de ces deux antibiotiques pendant les dix premières heures, par rapport à celle de chacun d'entre eux, en recherchant le nombre des staphylocoques survivants. Nous avons recueilli du sang à plusieurs reprises, après injection d'une ou des deux substances à plusieurs chiens, et recherché l'action de ces antibiotiques seuls ou associés, soit en sérum pur, soit dans le mélange à parties égales de sérum et de bouillon à pH 7,2-7,3, après ensemencement aussi homogène que possible et après des durées de contact variées.

Voici quelques résultats obtenus dans une première expérience, destinée à rechercher l'action bactéricide des sérums prélevés chez un chien ayant reçu 300 000 U. O. de phényracilline, comparativement à celle des sérums d'un chien recevant 300 000 U. O. de phényracilline et 300 000 U. ( $\mu$ g) de DHS. Après des durées de contact plus ou moins prolongées nous avons prélevé des quantités identiques (0,2 ml) de chaque tube et effectué les numérations des germes survivants sur plaques de gélose nutritive. Les lectures ont été faites après quarante-huit heures (tableau III).

TABLEAU III. — Nombre de germes/ml.

			HEURES DE PRÉLEVEMENTS DES SÉRUMS APRÈS L'INJECTION D'ANTIBIOTIQUES						
	DURÉE DE CONTACT	T	1	2	3	6	8	10	
Sérum phenyracilline	14 H.	12.800	360	460	900	930	1040	1400	
	36 H.	10 <sup>5</sup> à 10 <sup>6</sup>	0		30	40	50	100	
	60 H.		0	0	0	0	20	40	
Sérum phenyra- cilline (1partie) + Bouillon (1partie)	14 H.	> 10 <sup>6</sup>	1200	1000	2500	2200	6630	44800	
	36 H.	> 10 <sup>6</sup>	10	30	50	220	46.000	161.280	
	60 H.	> 10 <sup>6</sup>	0	20	0	20	10 <sup>5</sup> à 10 <sup>6</sup>	> 10 <sup>6</sup>	
Sérum phenyracilline et D. H. S.	14 H.		10	0	0	140	800	750	
	36 H.		0	0	10	0	0	0	
	60 H.	> 10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	
Sérum phenyracilline + D. H. S (1partie) + Bouillon (1partie)	14 H.		10	0	30	320	3300	4.000	
	36 H.		0	0	0	20	280	330	
	60 H.	> 10 <sup>6</sup>	0	0	0	20	160	1760	

Ce tableau met bien en évidence :

a) Une nette supériorité de l'association sur la phényracilline seule, qui se manifeste sous la forme d'une forte synergie entre

la phényracilline et la streptomycine au cours des dix premières heures après l'injection ;

b) L'action conjuguée du sérum et des antibiotiques dans les conditions de notre expérience.

Dans une deuxième expérience nous avons étudié l'action bactéricide de sérums, contenant, d'une part, de la DHS seule et, d'autre part, de la DHS et de la phényracilline. Dans cette expérience nous avonsensemencé dans une première série de tubes : 148 012 900 germes/ml, et dans la deuxième série dix fois moins : 14 801 290 germes/ml.

TABEAU IV. — Nombre de germes/ml. Temps de prélèvement des sérums.

	DURÉE DE CONTACT en Heures	T	1 H.	2 H.	3 H.	6 H.	8 H.	10 H.
Sérum - D.H.S.	14	$> 10^6$	0	0	70	5400	120.400	180 000
	36	$> 10^7$	0	0	0	172.800	$> 10^7$	$> 10^7$
	60		0	0	0	$> 10^6$	$> 10^7$	$> 10^7$
	84		0	0	100	$> 10^6$	$> 10^7$	$> 10^7$
	108	$> 10^7$	0	0	300	$> 10^6$	$> 10^7$	$> 10^7$
Sérum - D.H.S. (1 partie) + Bouillon (1 partie)	14	$> 10^7$	0	0	$10^5 - 10^6$	$10^5 - 10^6$	$> 10^6$	$> 10^6$
	36		0	0	$> 10^6$	$10^5 - 10^6$	$> 10^7$	$> 10^7$
	60		0	0	$> 10^6$	$10^5 - 10^6$	$> 10^7$	$> 10^7$
	84		0	0	$> 10^6$	$> 10^7$	$> 10^7$	$> 10^7$
	108	$> 10^7$	0	0	$> 10^7$	$> 10^7$	$> 10^7$	$> 10^7$
Sérum (D.H.S. + Phényracilline)	14	$> 10^6$	0	0	0	300	2 130	80 000
	36		0	0	0	0	20	8 400
	60		0	0	0	0	0	220
	84		0	0	0	0	0	0
	108	$> 10^7$	0	0	0	0	0	0
Sérum (D.H.S. + Phényracilline) (1 partie) + Bouillon (1 partie)	14	$> 10^7$	0	0	40	1 050	$10^5 - 10^6$	$10^5 - 10^6$
	36		0	0	0	0	8 700	45 400
	60		0	0	0	10	1 540	2 550
	84		0	0	0	0	520	160
	108	$> 10^7$	0	0	0	0	90	320

Les tableaux IV et V résument nos résultats :

A. Ensemencement  $> 10^8$  germes/ml (tableau IV).

B. Ensemencement  $10^7$  à  $2 \times 10^7$  germes/ml (tableau V).

TABLEAU V.

	DURÉE DE CONTACT en heures	T	1 H.	2 H.	3 H.	6 H.	8 H.	10 H.
Sérum-D.H.S.	14	$>10^6$	0	0	100	12.800	22.400	$10^5 - (2 \times 10^5)$
	36	$>10^7$	0	0	10	50	$10^6 - 10^7$	$>10^7$
	60		0	0	0	0	$>10^6$	$>10^7$
	84		0	0	0	0	$>10^6$	$>10^7$
	108	$>10^7$	0	0	0	0	$>10^7$	$>10^7$
Sérum-D.H.S. (1 partie) + Bouillon (1 partie)	14	$>10^7$	0	470	11.080	38.000	$10^5 - (2 \times 10^5)$	$>10^7$
	36		0	0	13.000	$10^6 - 10^7$	$>10^7$	$>10^7$
	60		0	0	28.160	$10^6 - 10^7$	$>10^7$	$>10^7$
	84		0	0	25.600	$>10^7$	$>10^7$	$>10^7$
	108	$>10^7$	0	0	34.560	$>10^7$	$>10^7$	$>10^7$
Sérum (D.H.S. + Phényracilline)	14	$>10^6$	0	0	40	1.050	$10^5 - (2 \times 10^5)$	$10^5 - (2 \times 10^5)$
	36		0	0	0	10	10	3.700
	60		0	0	0	0	0	90
	84		0	0	0	0	0	10
	108	$>10^7$	0	0	10	0	0	70
Sérum (D.H.S. + Phényracilline) (1 partie) + Bouillon (1 partie)	14	$>10^7$	0	0	0	7.700	10.000	$>10^6$
	36		0	0	0	30	1.600	25.400
	60		0	0	0	0	110	1.160
	84		0	0	0	0	40	80
	108	$>10^7$	0	0	0	0	10	10

Ces tableaux montrent que :

a) Il y a une synergie entre la dihydrostreptomycine et la phényracilline ; cette synergie se manifeste sous forme d'une véritable potentialisation durant tout le temps de l'expérience.

b) Cette synergie est de plus en plus manifeste au fur et à mesure que la durée de contact augmente.

#### CONCLUSION.

Ce travail met en évidence les faits suivants :

a) La phényracilline, très bien tolérée par le chien, se présente comme une pénicilline-retard, qui assure pendant les vingt-quatre premières heures des concentrations sanguines très supérieures à celles du sel de la N N'-dibenzyléthylènediamine avec la pénicilline (benzathine pénicilline) ;



b) Injectée à doses égales (300 000 unités) avec la dihydrostreptomycine elle agit avec cet antibiotique en synergie avec potentialisation des effets pendant les dix heures qui suivent l'injection et dans les conditions de notre expérience.

## SUMMARY

### EXPERIMENTAL DATA ON PHENYRACILLIN AND ITS ASSOCIATION WITH DIHYDROSTREPTOMYCIN.

The following facts have been demonstrated :

a) Phenyracillin is quite well tolerated by dogs. It behaves like a penicillin endowed with protracted activity, inducing during the first 24 hours much higher blood concentrations than those obtained with benzathine-penicillin.

b) When associated with the same doses of dihydrostreptomycin (300 000 U.), it exercises a synergic effect and enhances the action of dihydrostreptomycin during the 10 hours following injection.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] NOMINÉ (G.), MATHIEU (J.), JEQUIER (R.) et BELLET (P.). *Ann. Pharm. franç.*, 1958 (*sous presse*).
  - [2] PENAU (H.), VELU (H.), DESTOUCHES (P.) et KARATCENTZEFF (N.). *Rev. Immunol.*, 1950, **14**, 301.
  - [3] PRATT (R.) et DUFRENOY (J.). *Stain Technology*, 1946, **23**, 187.
  - [4] SUREAU (B.) et CHABBERT (Y.). *Biol. méd.*, 1948, **37**, 1.
  - [5] CSERMELY (E.). *Minerva Medica*, 1957, **48**, 4107.
  - [6] MARSON (P.) et AZERAD (E.). *Gaz. méd. France*, 1958, **65**, 1091.
  - [7] BEERENS (H.) et MACQUET (V.). *Presse méd.*, 1958, **66**, 1418.
-

# **SUR LE POUVOIR PATHOGÈNE DE CERTAINES SOUCHES DE VIBRIONS HABITUELLEMENT CONSIDÉRÉS COMME SAPROPHYTES**

par H. JACOTOT, J. LEVADITI et A. VALLÉE (\*)  
(avec la collaboration technique de A. LE PRIOL).

(*Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale  
et Service d'Anatomie Pathologique*)

Plusieurs fois, au cours des dernières années, nous avons isolé, en partant d'avortons de vaches, des vibrions aptes à se multiplier abondamment sur les milieux aérobies usuels, comme des vibrions saprophytes, mais possédant un pouvoir pathogène très prononcé pour la femelle gestante de cobaye. Nous rapporterons ici les résultats de l'étude que nous avons faite de trois de ces souches.

## **ORIGINE DES SOUCHES.**

*Souche B2* (Yonne), obtenue du cerveau d'un fœtus de vache expulsé après huit mois et demi de gestation ; dans la même étable, on avait isolé trois semaines avant *V. fœtus* à partir du contenu stomacal d'un fœtus de 7 mois. Le vibron B2 est associé à *E. coli* ; trois filtrations sur bougie L3 ne permettent pas son isolement. On inocule la culture mixte, vibron et coli, à quatre femelles gestantes de cobayes, par voie péritonéale ; l'une meurt dans les vingt-quatre heures, les trois autres avortent dans les quinze heures ; le vibron est extrait, à l'état de pureté, de la lumière utérine de l'une de ces dernières, de la lumière utérine et des fœtus d'une autre.

*Souche B4* (Seine-et-Marne), obtenue du testicule d'un fœtus de vache expulsé après sept mois de gestation ; dans la même étable, on avait isolé sept semaines avant *V. fœtus* à partir du cordon ombilical d'un fœtus de 6 mois. La première culture du vibron B4 est polluée ; un passage sur bougie L3 permet d'obtenir le microbe à l'état de pureté.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

*Souche R* (Haute-Saône), obtenue de tous les viscères d'un fœtus de vache expulsé après huit mois de gestation ; la première culture n'est pas pure ; on la passe sur bougie L3 ; le vibron franchit à l'état de pureté une bougie qui a été maintenue dans le bouillon de culture, pendant quinze heures.

#### CARACTÈRES CULTURAUX ET MORPHOLOGIQUES.

Les souches B2 et R ont été bien étudiées. Elles se développent d'emblée en bouillon et sur gélose ordinaires. En bouillon on

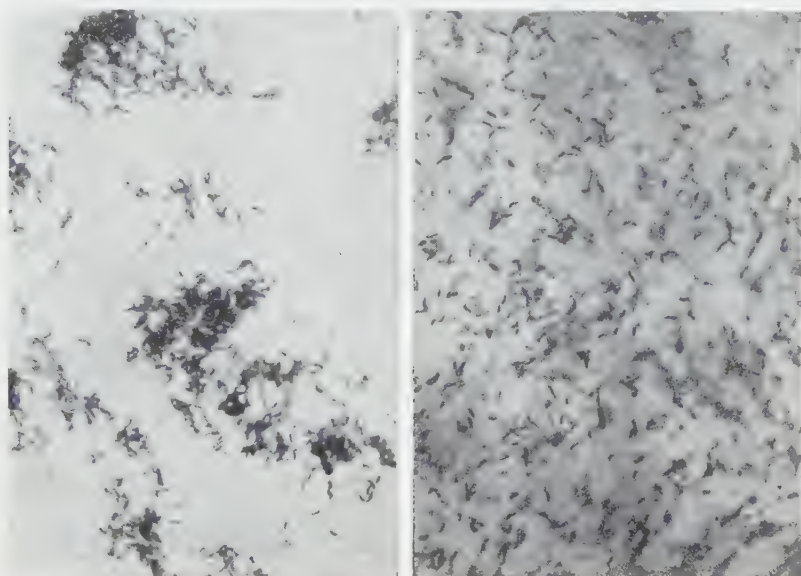


FIG. 1. — Vibron B4. Étalements de culture en bouillon. Coloration de Gram. A gauche var. non irisée, à droite var. irisée. Oc.  $\times 6$  phot., Ob.  $\times 50$  imm., Gr.  $\times 610$ .

observe après vingt-quatre heures des éléments très mobiles, en bâtonnets dont certains présentent un espace clair après coloration, ou en virgules, en S ouverts, ou encore en spirilles. Sur gélose ordinaire une dissociation se produit, qui donne des colonies irisées à reflets vert pâle et des colonies non irisées. Après étalement et coloration les microbes constituant les colonies irisées diffèrent quelque peu de ceux des colonies non irisées ; ils sont formés pour une part plus importante d'éléments courts, incurvés ou en S et pour une part moins importante d'éléments spiril-



lares fins et longs. Dans l'eau de condensation on observe des éléments semi-lunaires dont la partie centrale se colore mal et qui présentent à chacune de leurs extrémités une granulation se colorant fortement. Les repiquages en bouillon gélosé à 2 p. 1000 des variétés irisées et non irisées conduisent à des constatations analogues (fig. 1).

#### CARACTÈRES BIOCHIMIQUES.

Ces microbes possèdent en commun avec *V. fetus* plusieurs caractères fondamentaux : ils ne forment pas d'indole, ne dégagent qu'inconstamment de l' $\text{SH}_2$  et ne liquéfient pas la gélatine ; mais, contrairement à *V. fetus*, ils poussent après ensemencement par piqûre en gélose profonde et se multiplient en milieu hyper-tonique (1).

#### PROPRIÉTÉS SÉROLOGIQUES.

Des lapins ont été préparés par des inoculations intraveineuses en série de suspensions de chacune de ces souches ; leurs sérums se sont montrés agglutinants vis-à-vis de l'antigène correspondant à des taux voisins du 1/15 000 ; 6 sur 8 étaient totalement dépourvus d'agglutinines vis-à-vis des antigènes préparés avec *V. fetus*, et notamment avec la souche 483 de Florent ; mais 2 (B2 irisée et B2 non irisée) agglutinaient cet antigène à la dilution de 1/120. Ce titre n'a pas de signification en matière de vibriose, mais si faible qu'il soit, il ne laisse pas de surprendre chez le lapin dont le sérum est toujours totalement inactif au départ.

#### POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE COBAYE.

Il est parfaitement caractérisé et s'exerce à l'égard des femelles vides aussi bien que des femelles gestantes.

La *variété non irisée* de la souche B2 a été inoculée par voie péritonéale à 8 femelles gestantes ; elle a déterminé l'avortement dans les vingt-quatre heures chez 6 d'entre elles et dans les quarante-huit heures chez une autre ; le vibriion été retrouvé dans la lumière de l'utérus chez 6 de ces femelles. Enfin, une femelle non gestante qui avait été inoculée dans les mêmes conditions est morte dans les quarante huit heures ; le vibriion a été retrouvé dans tous les viscères et dans la lumière des deux cornes utérines.

La *variété irisée* de la même souche a été inoculée à 12 cobayes gestantes ; 8 sont mortes dans des délais très courts, inférieurs à un jour, avant même que l'expulsion des fœtus ait pu s'effec-

(1) Nos constatations concordent avec celles du Dr A. Florent, de Uccle - Bruxelles, que nous remercions d'avoir bien voulu examiner les souches B2 et B4.

tuer ; le vibron a été retrouvé régulièrement dans le foie et dans le sang du cœur, et chez plusieurs animaux dans le cerveau, la lumière des cornes utérines ou les fœtus. En outre, 4 femelles ont avorté dans les vingt-quatre heures et, après sacrifice, le vibron a été retrouvé dans leurs viscères ainsi que dans la lumière utérine ou les fœtus. Enfin, 2 femelles qui n'étaient pas en gestation sont mortes dans les vingt-quatre heures ; le vibron a été retrouvé dans les viscères et dans la lumière des cornes utérines.

Dans toutes les expériences rapportées ici on a inoculé 1 cm<sup>3</sup> de culture en bouillon gélosé, avec addition de mucine, selon le protocole que nous avons fait connaître antérieurement, ou sans mucine [4].

#### POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE LAPIN.

Nous n'en avons pas fait l'étude méthodique, mais, au cours de la préparation des sérums agglutinants, plusieurs des lapins qui recevaient les suspensions de ces vibrions sont morts rapidement avec une vive congestion des viscères.

#### POUVOIR PATHOGÈNE POUR LES PETITS RUMINANTS.

Nous nous sommes adressés à des animaux de ce groupe parce que nous disposions de brebis et béliers, chèvres et boucs, animaux qui, dans les conditions naturelles, sont sensibles à la vibriose, les premiers surtout.

La suspension normale de culture sur gélose ordinaire de vingt-quatre heures inoculée dans la veine jugulaire aux doses de 10 cm<sup>3</sup> ou de 5 cm<sup>3</sup> a entraîné la mort dans 7 cas sur 12 chez les brebis et béliers, 2 cas sur 3 chez les chèvres et boucs ; il s'agissait alors de toxi-infections aiguës rapidement mortelles, le plus souvent en moins de douze heures. Dans les heures suivant l'inoculation, on a noté une forte dyspnée et des émissions sanglantes à l'anus et à la vulve. Lesensemencements effectués à partir des prélèvements usuels sur les cadavres sont toujours restés négatifs.

Le filtrat sur bougie L3 de culture en bouillon ordinaire de quatre jours, injecté dans la veine, à la dose de 25 cm<sup>3</sup>, a tué dans les mêmes délais un bélier sur deux ; un autre bélier est mort dans les mêmes conditions, après injection de corps microbiens obtenus sur gélose, tués par action du merthiolate, puis lavés trois fois dans l'eau physiologique.

Il paraît hors de doute que les vibrions en question sécrètent une exotoxine et il est vraisemblable qu'ils élaborent aussi une endotoxine, car il est peu probable que les accidents déterminés

par les microbes tués et lavés soient dus à une exotoxine non libérée.

Il semblerait, le nombre d'animaux inoculés n'autorisant pas une appréciation plus formelle, que la souche B2, plus pathogène, soit douée d'un pouvoir toxique plus élevé que la souche B4 et

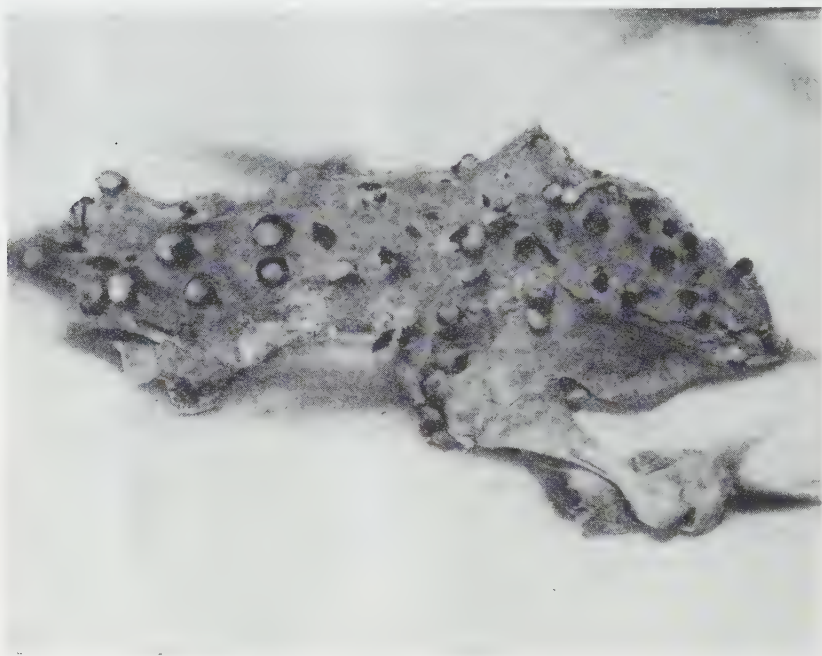


FIG. 2. — Brebis 343 inoculée avec une culture sur gélose et morte en douze heures : lésions hémorragiques de l'utérus intéressant notamment les cotylédons.

que, de cette souche B2, les éléments formant des colonies non irisées soient plus toxiques que les autres.

Les lésions macroscopiques se présentent avec une constance remarquable, mais offrent des degrés variables avec l'intensité des troubles et la durée de leur évolution. A l'autopsie des animaux morts dans de courts délais (dix à quinze heures) on note les altérations suivantes : épanchement pleural rose plus ou moins abondant, parfois coagulé ; congestion pulmonaire avec îlots de pneumonie et petites hémorragies dans le parenchyme ; suffusions sous la plèvre pariétale ; myocarde décoloré, suffusions sous le péricarde et sous l'endocarde le long des piliers ventriculaires et à la surface des valvules et des oreillettes, sur-



tout dans le cœur gauche ; foie dégénéré et vésicule distendue ; splénomégalie avec ramollissement de la pulpe ; reins congestionnés ; muqueuse vésicale enflammée, piquetée d'hémorragies ; congestion intestinale violente avec pétéchies, dans certaines parties du grêle surtout. Il faut signaler enfin des altérations utérines parfois intenses ; chez une brebis (n° 343), nous avons observé des hémorragies sous-muqueuses multiples coiffant les cotylédons dans la partie profonde des cornes, ou formant à leurs

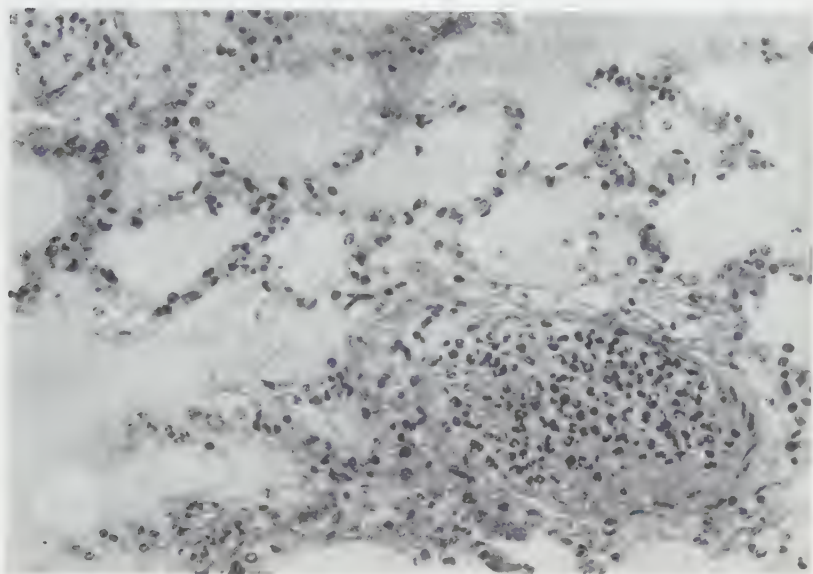


FIG. 3. — Bouc 353 inoculé avec une culture en bouillon de *V. foetus* et mort en quelques heures. Broncho-pneumonie suraiguë oedémateuse et nécrosante avec importante polynucléose dans un rameau d'une des veines pulmonaires. Ex. Y, 256. Hémalun-éosine-safran. Oc.  $\times 6$ , Ob.  $\times 23$ , Gr.  $\times 200$ . Ecran Wratten 15 (M<sup>me</sup> O. Nazimoff et J. Grzelak).

bases des anneaux ou des croissants, dans le voisinage du col (fig. 2).

Les examens histo-pathologiques ont permis des constatations supplémentaires dont nous donnons ici un exposé global :

*Bélier 346* mort douze heures après l'inoculation intraveineuse de 5 cm<sup>3</sup> de culture en bouillon de 24 heures de la souche B2.

*Examen X 2.273.* — Poumon : broncho-pneumonie suraiguë hémorragique et suppurée avec exsudat fibrineux bronchique et alvéolaire.

Foie : cellules hépatiques granuleuses ; hémolyse portale avec mono-

cytes et cellules endothéliales desquamées en placards dans la lumière des branches de la veine porte.

Rein : destruction massive aiguë du parenchyme rénal avec hyperémie hémorragique interstitielle. Vacuolisation des tubes et nécrose des glomérules sont les signes d'une néphrite toxique aiguë.

Bélier 347 mort dix-huit heures après l'inoculation intraveineuse de 25 cm<sup>3</sup> de filtrat sur bougie L3 de la même culture.

Examen X 2.274. — Poumon : petits foyers d'hyperémie hémorragique avec alvéolite œdémateuse ; les cellules rétractées à noyaux pyknotiques témoignent d'une action cytotoxique directe.

Foie : dégénérescence granuleuse des cellules hépatiques avec nécrose des cellules de Küpffer et décollement des endothéliums des capillaires sinusoides.

Rein : extrêmement hémorragique avec lésions épithéliales des tubes identiques à celles relevées chez le bélier 346. Néphrite aiguë glomérulo-épithéliale de cause toxique évidente.

La figure 3 montre les lésions pulmonaires d'un bouc (n° 353) mort de broncho-pneumonie suraiguë, œdémateuse, dix heures après l'inoculation intraveineuse de 5 cm<sup>3</sup> de culture en bouillon de la même souche B2 (Examen Y 256).

Pour terminer cet exposé sommaire d'histo-pathologie, nous signalerons deux particularités. La rapidité de l'évolution et la gravité des lésions œdémateuses et hémorragiques sont parfois telles qu'elles font penser à un phénomène de Reilly (chèvre 337). D'autre part, chez les sujets qui survivent, la régression des accidents pulmonaires peut être assez lente pour que, macroscopiquement et microscopiquement, les lésions gardent le caractère infectieux aigu pendant plusieurs semaines (brebis 333).

#### CONCLUSIONS.

Certaines souches de vibrions qui possèdent les principaux caractères biochimiques de *V. fetus*, mais qui s'en différencient sérologiquement et se développent abondamment en aérobiose dans les milieux de culture ordinaires, possèdent vis-à-vis du cobaye et en particulier de la femelle gestante de cobaye un pouvoir pathogène comparable à celui des souches les plus virulentes de *V. fetus*. Cultivées dans les milieux usuels, elles élaborent des substances toxiques capables de tuer en moins de douze heures les ovins et les caprins. Après inoculation intraveineuse de quelques centimètres cubes, de tels animaux présentent presque toujours des lésions intenses de broncho-pneumonie œdémateuse et nécrosante et souvent des altérations hémorragiques et dégénératives du rein. Les lésions sont pratiquement identiques chez les animaux n'ayant reçu que le filtrat de culture.

Trois notions nous paraissent découler de ces constatations :

1° L'action pathogène sur le cobaye ne saurait différencier sûrement de *V. fœtus* certains vibrions considérés habituellement comme des microbes saprophytes.

2° De tels vibrions isolés à plusieurs reprises se révèlent d'un pouvoir toxigène puissant.

3° On est, pour le moins, en droit de se demander si, dans les conditions naturelles, ces microbes sont réellement inaptes à déterminer des troubles dans les espèces domestiques.

## SUMMARY

### PATHOGENICITY OF CERTAIN *VIBRIO* STRAINS, USUALLY CONSIDERED AS SAPROPHYTIC.

Certain *Vibrio* strains possess the main biochemical properties of *Vibrio fœtus*, but are serologically different from it, and grow abundantly in usual culture media in aerobic conditions. These strains possess for guinea pigs, and particularly pregnant females, a pathogenicity as high as that of the most virulent strains of *Vibrio fœtus*. In usual media, they excrete toxic substances, which kill sheep and goats in less than twelve hours. After intravenous inoculation of a few cubic centimeters, these animals almost always show severe lesions of acute broncho-pneumonia, and often hemorrhagic and necrotic kidney and liver alterations. The lesions are practically identical in animals only receiving culture filtrates.

Three conclusions can be drawn from these findings :

1. The pathogenicity for guinea pigs is not sufficient to constitute a differential character between *Vibrio fœtus* and certain *Vibrios* usually considered as saprophytic.

2. Such non unfrequently isolated *Vibrios* are highly toxigenic.

3. The incapacity of these germs to induce diseases in domestic animals is questionable.

## BIBLIOGRAPHIE

[4] JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 591.

---

## **CROISSANCE ET TOXINOGENÈSE DIPHTÉRIQUES EN CULTURE AGITÉE, SUR MILIEU SYNTHÉTIQUE**

par M. RAYNAUD, J. ALOUF et R. MANGALO (\*).

*(Institut Pasteur, Annexe de Garches)*

Divers auteurs ont obtenu des taux élevés de toxine diphtérique en culture agitée [4, 5]. Nous avons, il y a quelques années [6], étudié les rapports entre la croissance et la toxinogénèse du bacille diphtérique et montré que, contrairement à ce que l'on observe avec d'autres toxines, la concentration endocellulaire de toxine diphtérique reste toujours très faible, pratiquement négligeable. La toxine est excrétée pendant la phase exponentielle de croissance. Nous avons utilisé pour ces expériences des milieux complexes [7, 8] ou semi-synthétiques [9, 10], avec des résultats qualitativement semblables. La toxine apparaissait très précocement dans le milieu de culture. En 1957, Yoneda et Pappenheimer [11] ont effectué une étude analogue sur milieu synthétique et sont arrivés à des conclusions très différentes des nôtres. Ils considèrent que le bacille diphtérique ne libère que des traces de protéine extracellulaire et de toxine pendant la phase exponentielle de croissance. Ces auteurs ayant utilisé une souche particulière (souche Yoneda) [11 bis] capable de pousser sur un milieu synthétique très simple, on pouvait se demander si la divergence entre leurs résultats et les nôtres résultait de ces conditions particulières.

Nous avons donc repris l'étude de ce problème avec la souche Yoneda et un milieu synthétique simple analogue à celui de cet auteur [11, 12].

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES.**

La souche utilisée a été obtenue à partir d'une souche que nous avait adressée le Dr Yoneda, que nous sommes heureux de remercier ici. Cette souche, qui pousse bien sur le milieu de cet auteur, poussait mal et irrégulièrement sur notre milieu où l'acide glutamique est utilisé comme source principale d'azote, au lieu de l'asparagine. La pousse était surtout médiocre en culture agitée.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.



Sur le même milieu en tube droit non agité, il se formait des voiles minces. En effectuant des passages alternés d'un voile âgé de 6 à 8 jours sur tube agité, d'un tube agité à une culture non agitée, etc., nous avons obtenu finalement une variante qui donnait une culture abondante en milieu agité ; mais le taux de toxine restait faible, 10 Lf/ml au maximum.

Le faible taux de toxine nous a paru provenir de l'hétérogénéité de la souche. Nous avons supposé que le pourcentage de germes toxigènes dans le clone considéré était relativement faible.

Nous avons alors étalé une série de suspensions obtenues par dilution d'une culture en phase exponentielle (culture agitée), dilutions telles que 0,5 ml étalé sur une boîte de Petri de 11 cm de diamètre, donnait naissance à 50-100 colonies. Le milieu employé était le milieu synthétique décrit, gélosé et additionné de sérum antidiphtérique, de façon à réaliser une concentration finale de 10 Lf (d'antitoxine) par millilitre. Les colonies toxigènes s'entourent d'une zone de précipitation, comme l'avait montré Ouchterlony dans ses premières expériences [13, 14].

Nous avons observé que toutes les colonies n'étaient pas toxigènes dans les conditions indiquées (concentration en antitoxine : 10 Lf/ml). Voici le résultat de quelques expériences :

Boîte	NOMBRE DE COLONIES ISOLÉES	POURCENTAGE DE COLONIES TOXIGÈNES
N° 1 .....	105	27 %
N° 2 .....	86	55 %
N° 3 .....	69	17 %
N° 4 .....	77	32 %
N° 5 .....	58	20 %

Nous avons alors repiqué systématiquement les colonies les plus toxigènes (c'est-à-dire celles qui donnaient l'anneau de précipitation de plus grand diamètre). A partir d'un des clones ainsi isolés, nous avons obtenu une souche qui paraît relativement stable et donne en culture non agitée 50-60 Lf/ml, en culture agitée 30 à 50 Lf/ml, dans les conditions optima. Cette souche est dénommée souche « Garches ». Elle est conservée sous forme d'une suspension dense en lait stérile, à l'état congelé ( $-15^{\circ}$ ).

La semence est préparée à partir d'une culture-stock ainsi conservée. Le contenu d'un tube, après décongélation, est inoculé à raison de 1 ml dans un tube contenant 5 ml de milieu synthétique (tube en T). Les tubes sont placés dans un agitateur basculant placé dans un bain-marie à  $34^{\circ}$  et agités pendant trois jours. On ensemente une série de tubes en T (5 ml de milieu), chacun avec 0,1 ml de la culture précédente. Le milieu contient 150  $\mu$ g de fer ajoutés par litre. On place au bain-marie à  $34^{\circ}$  avec

agitation pendant vingt-quatre heures. La culture est alors en pleine phase exponentielle. On peut aussi utiliser de gros tubes en T de 500 ml de capacité, contenant 50 ml de milieu.

Les germes sont recueillis stérilement par centrifugation (4 000 tours/minute) et remis en suspension dans un volume approprié de milieu synthétique stérile (sans fer ajouté).

#### MILIEU DE CULTURE.

Le milieu utilisé est voisin de celui décrit par Yoneda [41, 42] et a été mis au point par l'un d'entre nous [45]. Sa composition finale par litre est reproduite ci-dessous :

Maltose .....	18,800 g
Acide L(+) glutamique .....	8,010 g
DL-méthionine .....	0,400 g
L-cystine .....	0,400 g
Acide succinique .....	1,800 g
Acide lactique .....	1,809 g
Cl— .....	3,060 g
P .....	1,140 g
NH <sub>4</sub> + .....	0,157 g
(N total : 1,020)	
Mg++ .....	45,000 mg
Acide nicotinique .....	2,300 mg
β-alanine .....	2,300 mg
Acide pimélique .....	0,150 mg
Thiamine .....	0,250 mg
Cu++ .....	2,52 μg
Zn++ .....	1,80 μg
Mn++ .....	0,82 μg

On le prépare de la façon suivante (inspirée de la technique de Mueller et Miller [46]) :

#### Solution 1 :

Acide L(+) glutamique (chlorhydrate recristallisé) .....	10 g
DL-méthionine .....	0,4 g
PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> (R. P.) .....	5,0 g
Succinate de sodium, 6 H <sub>2</sub> O (Merck) .....	3,0 g
SO <sub>4</sub> Am <sub>2</sub> neutre (R. P.) .....	1,0 g
NaCl (R. P.) .....	1,3 g
Acide lactique pur (d = 1,248) .....	1,45 ml

Dans un Erlenmeyer de 300 ml, contenant 75 ml d'eau bidistillée chaude (60°-70°), on fait dissoudre les uns après les autres les produits ci-dessus. On laisse refroidir. On ajuste le pH à 7,8 par addition de lessive de soude. Le pH final est mesuré à l'électrode de verre (il faut environ 15 à 17 ml de lessive de soude). Compléter à 100 ml.

On élimine le fer par le procédé classique de Mueller. On ajoute pour cela à la solution précédente 1,5 ml d'une solution de CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O (R. P.) à 50 p. 100. On chauffe à l'ébullition douce que l'on maintient pendant cinq minutes. On laisse reposer et on filtre sur

un papier filtre, préalablement lavé avec de l'acide chlorhydrique dilué.

On ajoute au filtrat clair 0,5 ml de la même solution de  $\text{CaCl}_2$  et on répète l'opération précédente.

Le fer contenu dans les divers réactifs est ainsi éliminé (95 p. 100 sont éliminés).

La solution 1 est concentrée dix fois. On la dilue dix fois lors de la préparation du milieu définitif.

L'élimination du fer se fait mieux et est plus complète en opérant sur des solutions concentrées.

#### *Solution 2 :*

$\text{SO}_4\text{Mg}$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ .....	22,500	g
Acide nicotinique .....	0,115	g
$\beta$ -alanine .....	0,115	g
Acide pimélique .....	0,0075	g
Thiamine .....	0,0125	g
$\text{SO}_4\text{Cu}$ , 5 $\text{H}_2\text{O}$ solution à 1 p. 100 .....	5	ml
$\text{SO}_4\text{Zn}$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ solution à 1 p. 100 .....	4	ml
$\text{Cl}_2\text{Mn}$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ solution à 1 p. 100 .....	1,5	ml
HCl concentré (redistillé) .....	3	ml
$\text{H}_2\text{O}$ bidistillée .....	q. s. p.	100 ml

On dissout tous les constituants dans l'eau, sauf l'acide nicotinique qui est dissous à part dans 1 ml d'HCl concentré et ajouté au reste. La solution se conserve à la glacière pendant très longtemps.

#### *Solution 3 :*

L(—) cystine recristallisée .....	20	g
HCl concentré redistillé .....	20	ml
$\text{H}_2\text{O}$ bidistillée .....	q. s. p.	100 ml
Conservation à la glacière au moins six mois.		

#### *Solution 4 :*

$\text{SO}_4\text{Fe}$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ .....	0,496	g
HCl N/1 .....	100	ml
$\text{H}_2\text{O}$ .....	q. s. p.	1 000 ml

#### *Solution 5 :*

Maltose, 1 $\text{H}_2\text{O}$ (Merck) .....	100	g
$\text{PO}_2\text{Na}_2\text{H}$ , 12 $\text{H}_2\text{O}$ .....	6,5	g
$\text{H}_2\text{O}$ .....	q. s. p.	100 ml

Dissoudre le phosphate à chaud dans 130 ml d'eau. Ajouter le maltose par petites fractions jusqu'à dissolution totale. Compléter le volume à 200 ml.

Éliminer le fer : ajouter pour cela 4 ml de solution de  $\text{CaCl}_2$  à 50 p. 100. Placer l'Erlenmeyer dans un appareil agitateur-vibreux (appareil Jouan). Laisser agiter pendant dix minutes. On évite ainsi le chauffage du maltose. Filtrer. Ajuster le pH à 5,0 avec de l'acide chlorhydrique sans fer. Répartir en flacons. Stériliser à 105° pendant quinze minutes. On n'observe aucun brunissement lors de cette stérilisation. La solution reste à peine colorée. L'hydrolyse du maltose est négligeable.

Le milieu définitif est préparé en mélangeant les diverses solutions dans les proportions suivantes :

Solution 1 .....	100 ml
H <sub>2</sub> O .....	895 ml
Solution 2 .....	2 ml
Solution 3 .....	2 ml
Solution 4 fer q. s. p. taux de fer optimum, ici .....	150 µg fer/l

Le pH est voisin de 7,0-7,2. Répartir, Stériliser à 115° pendant vingt minutes. Ajouter stérilement au milieu la solution 5 stérile (maltose) : 4 ml pour 100 ml de milieu.

Le phosphate résiduel, après élimination des divers précipités, est

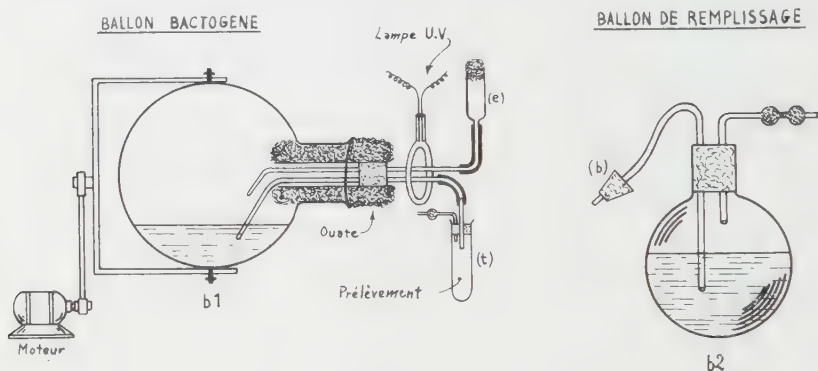


FIG. 1.

titré par la méthode de Fiske et Subbarow [17]. Exprimé en P, son taux est voisin de 1,12 g par litre.

Le milieu final, avant addition de fer, contient moins de 25 µg de fer par litre.

Le fer est dosé par la méthode de Jackson [18] modifiée par Woiwood [19], en utilisant comme complexant l'orthophénanthroline.

Le taux de Cl<sup>-</sup>, déterminé par la méthode de Charpentier-Volhard, est de 3,0 g par litre.

Pour suivre commodément les rapports entre la croissance et la toxinogénèse, il faut que la croissance ait lieu dans un récipient assez vaste, permettant de faire des prélèvements fréquents sans risque de contamination et sans que le volume total des prélèvements entraîne de modifications importantes du rapport entre la surface et le volume de la culture (ce rapport conditionne en effet la vitesse des échanges gazeux). Nous avons utilisé le dispositif du ballon tournant dérivé du ballon bactogène de Monod [20], et que nous avons décrit dans un travail antérieur [6]. Le ballon en pyrex a une capacité de 5 l et contient 1 l de milieu. La vitesse de rotation est de 60 tours/minute. L'agitation est très vive, mais le liquide ne mousse pas (fig. 1).

Le ballon et l'ensemble de l'appareil sont placés à la chambre-étuve, à 34° ± 0,5°.



La croissance a été suivie par détermination de la densité optique des suspensions microbiennes au photomètre Klett-Summerson, avec l'écran 54. Pour les suspensions denses, dépassant 200 unités Klett, il faut diluer les suspensions, la relation de proportionnalité entre l'N total bactérien et la densité optique n'étant valable qu'entre 0 et 200 unités Klett dans le cas du bacille diphtérique. Rappelons que 100 unités Klett correspondent à une densité optique de 0,200.

La correspondance entre le taux d'azote bactérien et la mesure de densité optique à l'appareil de Klett a été établie sur des suspensions obtenues par culture (sur le même milieu) de la souche Yoneda. Les germes ont été prélevés à divers moments au cours de la phase exponentielle. Le culot bactérien a été lavé trois fois avec de l'eau physiologique par centrifugation. L'azote total a été titré par la méthode de Kjeldahl. 100 unités Klett correspondent à 28  $\mu\text{g}$  N bactérien par millilitre.

La semence est prélevée comme il a été indiqué (après vingt-quatre heures de culture agitée sur le même milieu). La quantité de germes employée était telle qu'après homogénéisation au temps zéro dans le ballon tournant, la densité optique initiale (80) était comprise entre 40 et 60 unités Klett (moyenne, 14  $\mu\text{g}$  d'N bactérien par millilitre).

Le taux de fer ajouté était de 150  $\mu\text{g}$ /l. Ce taux est le taux optimum, dans les conditions indiquées, pour la toxino-génèse. Il a été déterminé après une série d'expériences portant sur des cultures agitées effectuées avec des taux variables de fer ajouté (de 0 à 4 000  $\mu\text{g}$  de fer).

La toxine a été titrée par floculation, selon la technique classique de Ramon [21]. On ne peut déceler ainsi qu'une concentration relativement élevée de toxine (environ 10 Lf/ml), si bien que la floculation ne permet pas de suivre les premiers stades d'apparition de la toxine.

C'est pourquoi nous avons aussi, dans tous les cas, effectué le titrage biologique de cette dernière.

Nous avons déterminé le nombre de DMR/ml. La DMR est définie selon Jensen [22] comme la plus faible dose de toxine qui, injectée par voie intradermique au lapin blanc sous le volume de 0,1 ml, provoque l'apparition d'une zone érythémateuse de 8 mm, la lecture étant faite au bout de quarante-quatre heures. La détermination exacte est facilitée par l'injection d'une série de dilutions sous la peau du lapin dans la région dorsale, selon la méthode de Jerne [23]. Pour chaque détermination, on utilise 10 dilutions environ et on emploie 2 à 4 lapins. Le chiffre donné correspond à la moyenne de ces déterminations.

La correspondance entre les unités de floculation et le nombre de DMR/ml n'est pas fixe.

Pour une toxine purifiée, apparemment dépourvue de toxoïde, nous avons retrouvé la valeur donnée par Jerne : 1 Lf/ml = 200 000 DMR/ml.

Lorsqu'on examine les toxines prélevées à divers stades de la croissance, on observe des variations dans la correspondance entre le pouvoir floculant et le pouvoir toxique. C'est pourquoi

nous n'établirons pas de conversion entre ces deux types d'unités, et donnerons les concentrations déterminées expérimentalement en Lf/ml et en DMR/ml.

La floculation a été faite dans tous les cas :

1° Avec un sérum étalon local (sérum ER) qui a été soigneusement standardisé vis-à-vis du sérum étalon international de floculation.

Ce sérum, comme tous les sérums commerciaux, est un sérum complexe [24, 25].

2° Avec un sérum à une zone [24, 25] (sérum 1451 bis) qui ne donne de réaction qu'avec la toxine diphtérique purifiée, sans présenter de réaction avec les antigènes accessoires.

Nous n'avons pas trouvé d'écart entre les deux types de détermination. Ceci indique que (dans le cas qui nous intéresse à tout

TABLEAU I.

Temps (heures)	Croissance (unités Klett)	Toxine		N protéique soluble total µgN/ml	N prot./ N bact. x 100
		Lf/ml	DMR/ml		
0	40	Non décelable par floculation	4100		
1	47	id	4100		
2	43	id	100		
3	58	id			
4	74	id	100	1,93	9 %
5	105	id	200		
6	135	id	500		
7	155	id			
8	210	id	500		
9	280	id			
10	340	id		7,15	7 %
11	380	id	3000		
12	570	id	30000		
13	600	id			
14	680	id	240000	24,09	4,5 %
15	750	id			
16	800	7,5	8.10 <sup>6</sup>	33,8	6,2 %
18	965	10			
26	1900	25	10 <sup>7</sup>	55,3	9,8 %
33	2100	40			
48	2100	50	10 <sup>8</sup>		

le moins) la floculation mesure bien la concentration de la toxine et non celle d'antigènes accessoires.

L'examen des filtrats par précipitation spécifique en gel confirme cette interprétation.

L'azote protéique soluble total représente l'ensemble des protéines et des peptides précipitables par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 que les germes ont libérés dans le milieu. Il est déterminé sur le liquide surnageant obtenu après élimination des germes par centrifugation à la centrifugeuse « International » (20 000 tours/minute, quinze

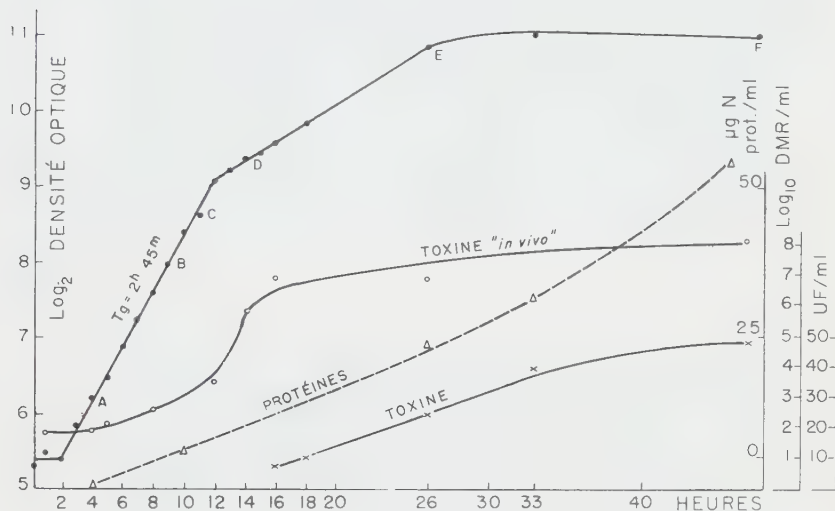


FIG. 2.

minutes). Après addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 10 p. 100, on laisse le précipité se former pendant une heure. On lave deux fois à l'acide trichloracétique à 5 p. 100. On dissout le précipité dans la soude N/1 et on effectue le transfert et le lavage dans les mêmes conditions que pour les précipitations quantitatives. L'azote total est titré après kjeldahlisation. L'ammoniaque est distillé dans un appareil type Markham modifié.

L'analyse immunologique de certains surnageants a été effectuée, après concentration par la méthode de Oudin [26], technique Oakley-Fulthorpe [27] et par celle d'Ouchterlony [28].

La concentration a été réalisée par ultrafiltration selon Quigley [28 bis] et Ramshorst [28 ter]. 1 000 ml de milieu ont été ramenés ainsi à 20 ml. Cette technique évite la dénaturation des constituants protéiques.

Huit expériences identiques ont été effectuées. Nous avons résumé les résultats de l'une d'entre elles dans le tableau I et la figure 2.

## DISCUSSION.

Ces résultats démontrent que, dans les conditions de taux optimum de fer pour la toxinogénèse (ici, 150  $\mu\text{g}$  de fer par litre), la croissance s'effectue selon les lois normales. On observe une phase exponentielle nette, durant, avec le type d'inoculum choisi, douze heures au moins. Le temps de génération pour la souche employée est de deux heures quarante-cinq minutes. Puis une phase de croissance ralentie se manifeste, qui dure douze à seize heures, avant que la croissance ne cesse.

Si on mesure la toxine formée par floculation, on ne trouve de toxine qu'à partir de la seizième heure et la courbe obtenue, extrapolée, ne semble pas passer par l'origine.

Mais si on détermine la toxine par titrage biologique, beaucoup plus sensible, on constate que la toxine est sécrétée dans le milieu dès la deuxième heure de la croissance. La quantité de toxine sécrétée augmente très vite pendant toute la période de croissance exponentielle et continue à augmenter pendant la phase de croissance ralentie.

On remarquera que, grâce à l'emploi d'un inoculum prélevé en phase exponentielle dans un milieu analogue, la période de latence est de très courte durée.

Les expériences de Yoneda et Pappenheimer [41] ont été faites dans des conditions différentes. Elles étaient inspirées par l'hypothèse que la toxine ne se produit que lorsque les bactéries se développent dans un milieu carencé en fer. La croissance a donc été suivie dans un milieu complètement privé de fer, avec un inoculum très important et formé dans un milieu contenant 500  $\mu\text{g}$  de fer par litre.

## LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — (1) Filtrat de culture de 8 heures concentré cent fois. (2) Filtrat de culture de 10 heures concentré cinquante fois. (3) Filtrat de culture de 18 heures concentré vingt fois. (4) Filtrat de culture de 48 heures en excès de fer (4 000  $\mu\text{g}$  fer/l). Dans chaque tube, la couche inférieure contient du sérum antidiphthérique complexe 906 (concentration finale, 100 Lf/ml). La ligne principale visible en 1 ne correspond pas à la toxine, mais à un des antigènes accessoires (protéines P), comme le montre la figure 2. Il existe deux autres lignes, moins visibles sur le cliché. Avec un sérum à une zone, on n'observe qu'une ligne faible.

FIG. 2. — S. C. : sérum complexe (906), concentration 100 Lf/ml. S. P. : sérum à une zone, concentration 100 Lf/ml. 1, 2, 3, 4 comme sur la figure 1. Le filtrat 1 contient un antigène accessoire, donnant une réaction avec le sérum complexe et pas de réaction avec le sérum à une zone. Le filtrat 2 contient un antigène accessoire et une faible quantité de toxine.



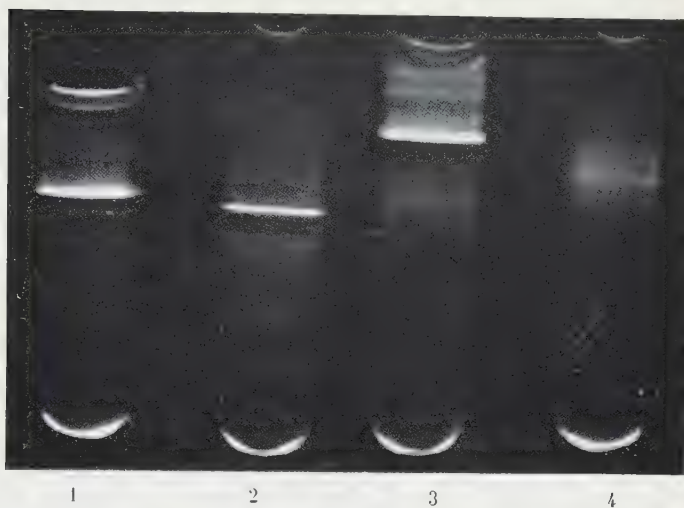


FIG. 1.

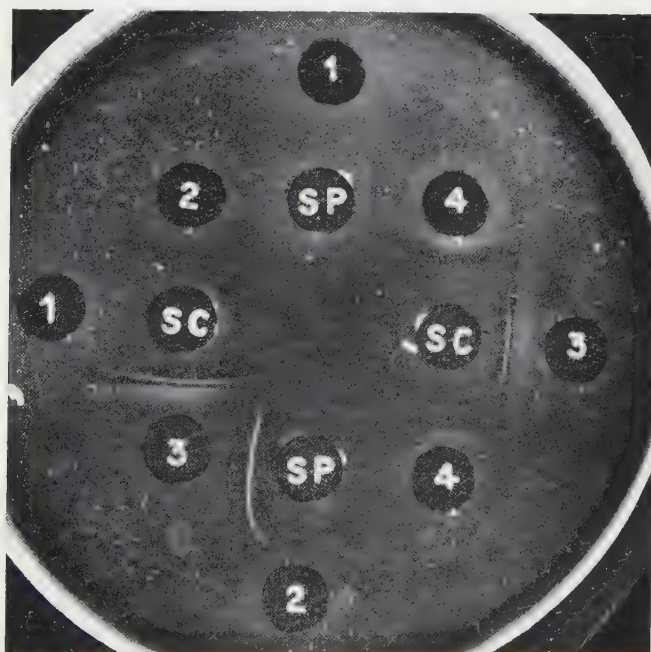


FIG. 2.



La culture entre alors très vite dans une phase de croissance ralentie et la phase exponentielle est très réduite ; d'où l'absence apparente de toxine pendant cette phase, absence qui paraît confirmée par le fait que la courbe : toxine en fonction du temps, extrapolée, ne passe pas par l'origine.

Les conclusions de Yoneda et Pappenheimer ne sont donc valables que dans les conditions particulières où se sont placés ces auteurs. Nous montrons ici qu'elles n'autorisent pas à étendre les conclusions qu'ils ont obtenues au cas général de la croissance en milieu optimum pour la toxinogénèse. Cependant, le taux de synthèse différentiel de la toxine est plus élevé pendant la phase de croissance ralentie que pendant la phase exponentielle.

De même, si l'on examine les chiffres de Mitsuashi et coll. [29] et que l'on établisse la courbe de croissance, on constate que pendant la phase de croissance exponentielle, le taux de toxine, comme dans nos expériences, était inférieur au seuil de détection par floculation. On ne peut conclure de ce résultat négatif, comme nous le montrons ici, à l'absence de synthèse de toxine diphtérique pendant cette phase.

La toxine sécrétée dans les premières phases de la croissance est par ailleurs bien identique, immunologiquement, à la toxine trouvée ultérieurement. Pour le vérifier, nous avons, dans des expériences parallèles, prélevé de grands volumes de filtrat de culture que nous avons concentrés par ultrafiltration.

PRÉLÈVEMENTS	CROISSANCE EN UNITÉS KLETT AU MOMENT DU PRÉLÈVEMENT	CONCENTRATION RÉALISÉE
1 : 8 heures .....	240	100
2 : 10 heures .....	320	50
3 : 18 heures .....	1 000	20

L'ultrafiltrat 1 concentré cent fois donne avec le sérum à 1 zone une ligne nette. Il contient donc la toxine diphtérique. Testé avec un sérum complexe (sérum 906), il donne trois lignes distinctes (pl., fig. 1). Une d'entre elles correspond à une des protéines P de la figure 2 de la planche. L'échantillon 4 dans cette figure correspond au filtrat concentré d'une culture en excès de fer qui ne contient pas de toxine, mais seulement les protéines P de Pappenheimer. On voit que certains des antigènes accessoires (antigènes diphtériques autres que la toxine) sont aussi sécrétés très précocement dans le milieu. On en voit déjà au moins 4 dans le prélèvement 3 (dix-huit heures). On note par ailleurs que l'antigène visible en 1 (huit heures) en boîte d'Ouchterlony est une des

protéines P. La toxine n'est visible qu'en tube d'Oakley (la technique en tube permettant de déceler les antigènes à des concentrations plus faibles que la technique Ouchterlony).

#### CONCLUSIONS.

Sur milieu synthétique, avec une souche particulière, comme sur milieu complexe avec la souche Park Williams n° 8 Toronto, on peut réaliser des cultures agitées de bacille diphtérique donnant des taux appréciables de toxine. La culture présente, comme avec tous les germes, une phase exponentielle suivie d'une phase de ralentissement de la croissance. Cette dernière phase est relativement longue lorsque le bacille diphtérique est cultivé sur milieu optimum pour la toxinogénèse, c'est-à-dire sur un milieu où le taux de fer est modéré (ici, 150 µg de fer par litre).

La toxine diphtérique, de même que certains des antigènes accessoires [31] ou protéines P [30] est sécrétée dans le milieu très précocement, vraisemblablement dès le début de la croissance.

La formation de toxine se fait à la vitesse la plus élevée pendant la phase de ralentissement de la croissance. Il n'a pas été possible d'établir de relation mathématique simple entre la quantité de toxine synthétisée et la quantité de germes formés dans un temps donné.

La toxine ne s'accumule apparemment pas à l'intérieur des germes et sa concentration endocellulaire reste toujours faible, contrairement à ce que l'on observe dans le cas des toxines tétanique et botulinique [6].

La toxine diphtérique n'est donc pas libérée dans le milieu par l'autolyse des germes.

La synthèse de la toxine diphtérique semble donc être un phénomène complexe. La nécessité d'une carence relative du milieu de culture en fer est indiscutable et bien établie sur le plan expérimental. Le mécanisme exact de ce phénomène reste à préciser, de même que les relations entre la lysogénie pour un prophage particulier et la toxinogénèse.

#### SUMMARY

##### DIPHTHERIA BACILLUS GROWTH AND TOXINOGENESIS IN AGITATED CULTURES, ON SYTHETIC MEDIA.

On synthetic media, with a particular strain, as on complex media with Toronto PW8 strain, it is possible to realize agitated cultures of diphtheria bacilli yielding non negligible toxin titers, The culture presents, as any other culture, an exponential phase,



followed by a slow growth phase. This last phase is of relatively long duration when diphtheria bacillus is grown on an optimum medium, i. e. on a medium with a moderate iron concentration (150 µg/liter).

Diphtheria toxin, like certain secondary antigens or P proteins, is very early secreted into the medium, probably from the beginning of the growth.

Toxin formation is highest during the second growth phase (slow growth). It was not possible to state a simple mathematical relationship between the amount of synthesized toxin and the number of germs formed during a given time.

Toxin does not seem to accumulate within the germs, and its endocellular concentration remains always low, contrarily to what is observed with tetanus and botulism toxins.

Diphtheria toxin is not released into the medium by autolysis of the germs.

Diphtheria toxin synthesis seems to be a complex phenomenon. The necessity of a relative iron deficiency in the medium is unquestionable and has been experimentally proved. The exact mechanism of this phenomenon is still to be precised, as also the relationships between lysogeny for a particular prophage and toxinogenesis.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LINGGOOD (F. V.). *Nature*, 1946, **157**, 264.
- [2] LINGGOOD (F. V.) et FENTON (E. L.). *Brit. J. exp. Path.*, 1947, **28**, 354.
- [3] LINGGOOD (F. V.). *Atti del VI Congresso Internaz. Microbiol.*, Rome, septembre 1953, **1**, 767.
- [4] LINGGOOD (F. V.), MATTHEWS (A. C.), PINFIELD (S.), POPE (C. G.) et SHARLAND (T. R.). *Nature*, 1955, **176**, 1128.
- [5] EDWARDS (D. C.). *Nature*, 1958, **182**, 190.
- [6] RAYNAUD (M.), TURPIN (A.), MANGALO (R.) et BIZZINI (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 599 et 1955, **88**, 24.
- [7] MARTIN (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, **12**, 26.
- [8] LOISEAU (G.) et PHILIPPE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 1214.
- [9] RELYVELD (E. H.), TURPIN (A.), LAFAILLE (A.), PARIS (C.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 301.
- [10] DREW (R. H.) et MUELLER (J. H.). *J. Bact.*, 1951, **52**, 549.
- [11] YONEDA (M.) et PAPPENHEIMER (A. M. Jr.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 256.
- [11 bis] YONEDA (M.). *Jap. J. Bact.*, 1950, **5**, 401.
- [12] YONEDA (M.). *Brit. J. exp. Path.*, 1957, **38**, 190.
- [13] OUCHTERLONY (O.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1948, **25**, 186.
- [14] OUCHTERLONY (O.). *Lancet*, 1949, **2**, 346.
- [15] ALOUF (J.). *Trèse Doctorat Pharmacie*, Paris, 1958.
- [16] MUELLER (J. H.) et MILLER (P.). *J. Immunol.*, 1939, **37**, 103.
- [17] FISKE (C. H.) et SUBBAROW (Y.). *J. biol. Chim.*, 1925, **66**, 375.
- [18] JACKSON (S. H.). *Ind. Eng. Chem. Anal. ed.*, 1938, **10**, 302.

- [19] WOIWOOD (A. S.). *Biochem. J.*, 1947, **41**, 39.
  - [20] MONOD (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 390.
  - [21] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 661 et 813.
  - [22] JENSEN (C.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1933, suppl. 14.
  - [23] JERNE (N. K.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1951, suppl. 87.
  - [24] RELYVELD (E. H.), GRABAR (P.), RAYNAUD (M.) et WILLIAMS (C. A. Jr). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 688.
  - [25] RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 631.
  - [26] OUDIN (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 115 et 1949, **228**, 1890 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 30 et 109 ; *Methods in Med. Research*, 1952, **5**, 335.
  - [27] OAKLEY (C. L.) et FULTHORPE (A. J.). *J. Path. Bact.*, 1953, **65**, 49.
  - [28] OUCHTERLONY (O.). *Arkiv Kemi Min. Geol.*, 1948, **26 B**, 1 et 1950, **4**, 43 et 55 ; *Progress in Allergy*, 1958, **5**, 1.
  - [28 bis] QUIGLEY (J. J.). *Am. J. Hyg.*, 1934, **20**, 218.
  - [28 ter] RAMSHORST (J. D.). *Thèse ès sci.*, Utrecht, 1951.
  - [29] MITSUASHI (S.), KUROKAWA (M.) et KOJIMA (Y.). *Japan J. exp. Med.*, 1949, **20**, 261 et 1951, **21**, 25.
  - [30] LAWRENCE (H. G.) et PAPPENHEIMER (A. M. Jr). *Am. J. Hyg.*, 1948, **47**, 226. — COHN (M.) et PAPPENHEIMER (A. M. Jr). *J. Immunol.*, 1949, **63**, 291.
  - [31] RAYNAUD (M.). « Heterogeneity of diphtheria antitoxin ». *Henry Ford Hospital Intern. Symposium*, Detroit, 1958.
-

# RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES

## SUR LE FACTEUR ACTIVATEUR

### DE LA POLYARTHRITE CHRONIQUE ÉVOLUTIVE

par G. MOUSTARDIER, Ch. DULONG de ROSNAY  
et P. Du PASQUIER (\*).

(Laboratoire de Bactériologie  
de la Faculté de Médecine de Bordeaux)

Le « Facteur Activateur » présent dans le sérum des malades atteints de polyarthrite chronique évolutive (P. C. E.) a surtout été étudié en tant que *facteur agglutinant*. On sait, en effet, depuis les travaux classiques de Waaler, de Rose, de Heller et de Svartz essentiellement, que le facteur est capable d'augmenter considérablement le pouvoir agglutinant d'un sérum humain vis-à-vis des hématies de mouton sensibilisées par un immunsérum. Plus récemment, les auteurs américains [1] ont montré que la réaction d'hémagglutination pouvait se faire avec des hématies humaines tannées et sensibilisées par de la globuline  $\gamma$ , qu'elle soit d'origine humaine ou animale.

Plus récemment encore, on s'est aperçu [2, 3] que l'on pouvait remplacer les hématies tannées par des *particules inertes* (colloïdion ou matière plastique) d'un diamètre convenablement choisi. La globuline  $\gamma$  peut se fixer à la surface de ces particules, et le système ainsi formé est agglutiné souvent à des taux remarquablement élevés par le sérum des malades atteints de P. C. E.

Il nous a paru intéressant de chercher à mettre en évidence le facteur activateur par des méthodes immunologiques plus directes, et en particulier par la méthode de double diffusion en gélose. Nous rapportons ici le détail de ces recherches qui, pour n'être encore que fragmentaires, n'en sont pas moins du plus haut intérêt, tant sur le plan pratique que théorique, et dont nous avons déjà donné le résumé dans une publication antérieure [4].

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 novembre 1958.

## TECHNIQUE.

La réaction se pratique dans des tubes de verre bien calibrés de 100 mm de hauteur sur 6 mm de diamètre intérieur.

La gélose utilisée est une gélose aussi limpide que possible à la concentration de 0,6 p. 100, tamponnée à pH 6,8-7,00 et à laquelle on ajoute environ 1 p. 10 000 de merthiolate de soude.

Les sérums à étudier sont décomplémentés à 56° pendant une demi-heure et conservés congelés en présence de merthiolate s'ils ne sont pas utilisés immédiatement.

Comme « substance réactive », nous nous servons de globuline  $\gamma$ , soit tout simplement du sérum hémolytique de lapin anti-mouton que l'Institut Pasteur fournit pour les réactions sérologiques classiques (et que nous utilisons pour les réactions de Waaler et Rose), soit de  $\gamma$ -globuline purifiée selon la méthode de Cohn (cette  $\gamma$ -globuline a été très aimablement mise à notre disposition par M. le professeur Pautrizel, que nous remercions), soit de  $\gamma$ -globuline préparée par nous-mêmes au laboratoire, selon une technique personnelle [5] dérivée de celle de Horesji et Smetana et qui utilise la précipitation de certains constituants sériques par le rivanol, ou lactate de 2-éthoxy-6,9 diamino-acridine.

La marche de la réaction est la suivante :

a) On place dans le fond du tube, avec une pipette semi-capillaire, le sérum jusqu'à un trait de jauge situé à 2 cm du fond ;

b) On dépose à la surface du sérum de la gélose liquide à la température de 45° ou 50°, jusqu'à un second trait de jauge situé à 1 cm au-dessus du premier ;

c) Pendant que la gélose est encore semi-fluide, on dépose à sa surface la solution de  $\gamma$ -globuline jusqu'à un troisième trait de jauge situé à 2 cm au-dessus du précédent.

On a donc successivement une couche de sérum de 2 cm, une couche de gélose de 1 cm, une couche de globulines  $\gamma$  de 2 cm. Nous n'insisterons pas sur les multiples précautions techniques dont il faut s'entourer. Rappelons, toutefois, qu'il est indispensable d'enduire la surface intérieure du tube d'un film de gélose que l'on laisse sécher avant de passer à toute autre opération.

Les tubes ainsi préparés sont recouverts, pour éviter l'évaporation et les souillures, et l'on observe toutes les vingt-quatre heures l'apparition éventuelle de bandes de précipitation dans la couche de gélose. La rapidité d'apparition de ces bandes, leur nombre, leur position initiale et le sens de leur migration sont autant de facteurs intéressants qui sont, pour une bonne part, sous la dépendance des concentrations respectives du sérum et de la solution de globuline  $\gamma$ .

## RÉSULTATS.

Nous avons étudié par cette méthode le sérum de 49 sujets, dont 36 étaient atteints de P. C. E., les 13 autres étant soit en bonne santé, soit atteints de dysglobulinémie plus ou moins importante et portant essentiellement sur la fraction  $\gamma$ .



La réaction classique de Waaler-Rose (W.-R.), selon la modification de Heller et de Svartz, et le test au latex, selon une technique personnelle [6], ont été pratiqués sur tous les sérums étudiés. Dans 15 cas, nous avons effectué, également, des réactions de précipitation interfaciale, selon la méthode décrite par Epstein [7].

a) Nos premiers essais concernent 10 sérums de P. C. E. ayant des titres allant :

Du 1/16 au 1/256 pour la réaction de W.-R. ;

Du 1/40 au 1/2 560 pour le test au latex.

Dans cette série, nous avons utilisé le sérum non dilué et l'avons testé contre le sérum hémolytique de l'Institut Pasteur dilué au 1/10. Nous avons obtenu sept fois sur dix des bandes de précipitation, apparaissant entre la quarante-huitième et la cent vingtième heure. Trois fois, l'on put observer une bande isolée, une fois deux bandes, trois fois trois bandes apparurent successivement. Dans trois cas, il n'y eut aucune précipitation après une observation de dix jours. Ajoutons que trois sérums normaux ne donnèrent lieu à aucune bande de précipitation.

b) Onze sérums de P. C. E. (réaction W.-R. de 1/64 à 1/256, réaction au latex de 1/40 à 1/2 560) furent éprouvés par rapport à la  $\gamma$ -globuline purifiée (méthode de Cohn). Le sérum fut utilisé pur ou dilué au 1/2 dans du sérum physiologique merthiolaté, la  $\gamma$ -globuline à la concentration de 3 mg au millilitre. Dans ces 11 cas, nous avons eu 11 résultats positifs : neuf fois une bande de précipitation ; une fois deux bandes de précipitation ; une fois trois bandes de précipitation.

c) Quinze sérums de P. C. E. (réaction de Waaler-Rose allant de 1/32 à 1/512, test au latex de 1/20 à 1/2 560) furent testés contre une solution de  $\gamma$ -globuline préparée par la méthode au rivanol, à la concentration de 3 mg au millilitre. Le sérum fut utilisé pur. Nous avons obtenu 3 résultats négatifs et 12 résultats positifs : neuf fois une bande de précipitation ; trois fois deux bandes de précipitation.

d) Dix sérums de sujets indemnes de P. C. E. et présentant une réaction de W.-R. et un test au latex négatifs, mais des troubles importants de la répartition des globulines à l'électrophorèse, furent testés contre de la  $\gamma$ -globuline purifiée par le rivanol (concentration de 3 mg au millilitre). Nous avons obtenu huit fois un résultat négatif et deux fois apparut une bande de précipitation après cinq jours d'observation (un rhumatisme articulaire aigu et une syphilis tertiaire).

e) Dans 15 cas pris parmi les précédentes séries, nous avons pratiqué une réaction de précipitation selon Epstein en mettant au contact, dans des tubes capillaires, le sérum du malade non

dilué et une solution de  $\gamma$ -globuline purifiée par le rivanol à la concentration de 3 mg au millilitre. Une réaction positive se traduit par l'apparition rapide (une heure environ à la température de la pièce) d'une bande de précipitation à l'interface, qui sédimente au fond du tube en vingt-quatre heures.

Dans 11 cas de P. C. E., nous avons eu 10 réactions positives.

Chez 4 malades indemnes de P. C. E., nous avons eu une réaction positive (le malade atteint de rhumatisme articulaire aigu cité plus haut).

#### DISCUSSION.

De ces travaux, encore très fragmentaires, on peut tirer quelques enseignements.

1° La réaction de Waaler-Rose, le test au latex et les réactions de précipitation sont *en étroite concordance*. Sur 36 sérums de malades atteints de P. C. E., nous avons eu au total : 34 réactions de Waaler-Rose positives ; 34 tests au latex positifs ; 30 réactions de précipitation en gélose positives.

La réaction de précipitation semble à priori moins sensible que les réactions d'agglutination.

2° Nous n'avons pas encore pu mettre en évidence de relation entre le taux de positivité des réactions d'agglutination et le nombre des bandes de précipitation ou leur rapidité d'apparition. Par ailleurs, si l'on dilue le sérum, la réaction devient très rapidement négative, en général après une dilution au 1/4. Tout ce que l'on peut dire, c'est que les sérums ayant un taux agglutinant très élevé donnent, le plus souvent, des bandes de précipitation qui migrent rapidement dans la couche de gélose et dans le sens sérum  $\rightarrow$   $\gamma$ -globuline.

3° Ces constatations suggèrent fortement que le phénomène exploré par la réaction de Waaler-Rose classique, par le test au latex et par les réactions de précipitation, est le même et *qu'il s'agit d'un phénomène immunologique* dans lequel la  $\gamma$ -globuline (ou le sérum hémolytique) jouerait le rôle d'antigène. Les travaux de Epstein et coll. [7] plaident en faveur de cette conception.

Il est évidemment tentant, pour se faire une idée plus précise, d'étudier le comportement du *complément* en présence d'un mélange de  $\gamma$ -globuline et de sérum de P. C. E. En utilisant une réaction de fixation du complément selon Kolmer, l'antigène étant représenté par de la globuline  $\gamma$ , nous avons eu jusqu'à maintenant des résultats très irréguliers et d'interprétation difficile. Dans quelques cas, cependant, il semble que nous ayons obtenu une fixation du complément à un taux significatif. Nous poursuivons nos recherches sur ce point.

## RÉSUMÉ.

Les auteurs ont appliqué les méthodes de diffusion en gélose à l'étude de la polyarthrite chronique évolutive. Leurs expériences ont été effectuées selon la technique en double diffusion. Elles ont porté sur un système immunologique composé, d'une part, d'une solution de  $\gamma$ -globuline humaine jouant le rôle d'antigène et, d'autre part, de sérum de malades présentant les stigmates cliniques et biologiques de la polyarthrite chronique évolutive. Dans 80 p. 100 des cas environ, il apparaît, en vingt-quatre ou quarante-huit heures, une ou plusieurs bandes de précipitation. Leur position par rapport à la zone sérum et leur déplacement à partir de leur position initiale semblent varier en fonction du taux de positivité du sérum à la réaction de Waaler-Rose classique. Des sérums témoins, prélevés chez des rhumatisants chroniques ne présentant pas de polyarthrite chronique évolutive, n'ont pas donné de bandes de précipitation.

Ces faits semblent confirmer les recherches antérieures des auteurs, qui ont étudié le système «  $\gamma$ -globuline-sérum de polyarthrite chronique évolutive » par diverses méthodes : a) agglutination de particules inertes selon une modification personnelle de la technique de Singer ; b) précipitation interfaciale en milieu liquide.

Il semble bien que l'ensemble de ces techniques mette en évidence une réaction antigène-anticorps authentique.

Une réaction de fixation du complément selon Kolmer, utilisant le même système immunologique, est en cours d'étude.

## SUMMARY

IMMUNOLOGIC STUDIES ON THE ACTIVATING FACTOR  
IN RHEUMATOID ARTHRITIS.

The authors have applied the double gel diffusion technique to the study of rheumatoid arthritis. The experiments have been carried out with an immunological complex constituted of a human  $\gamma$ -globulin solution as antigen, and sera of patients presenting the clinical and biological symptoms of rheumatoid arthritis. In about 80 % of the cases, one or several lines of precipitation appear within 24 to 48 hours. Their situation in relation to the serum zone and their shift from their initial position seem to vary according to the positivity rate of the serum towards the classical Waaler-Rose reaction.

Control sera taken from patients suffering from chronic rheumatism but not presenting rheumatoid arthritis, gave no line of precipitation.

These facts seem to confirm the previous findings of the authors, who have studied the  $\gamma$ -globulin-rheumatoid arthritis serum complex by means of different methods :

a) Agglutination of inert particles following a personal modification of Singer's technique.

b) Interfacial precipitation in liquid medium.

It seems that all these techniques demonstrate an actual antigen-antibody reaction.

A complement fixation reaction (Kolmer) with the same immunological complex is being studied.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] HELLER (H.), JACOBSON (A. S.), KOLODNY (M. H.) et KAMMERER (W. H.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 66.
  - [2] SINGER (M.) et PLOTZ (C. M.). *Am. J. Med.*, 1956, **21**, 888.
  - [3] RHEINS (M. S.), COY (F. W. Mc), BURRELL (R. G.) et BUEHLER (E. V.). *J. Lab. clin. Med.*, 1957, **50**, 113.
  - [4] MOUSTARDIER (G.), DULONG DE ROSNAY (Ch.) et DU PASQUIER (P.). *Résumés de travaux présentés au V<sup>e</sup> Congrès Int. Microbiol.*, Stockholm, août 1958, p. 160-161. G. Tunevall, édit., Upsala, 1958.
  - [5] DULONG DE ROSNAY (Ch.) et DU PASQUIER (P.). *Ann. Biol. clin.*, 1958, **16**, 363.
  - [6] DULONG DE ROSNAY (Ch.), DU PASQUIER (P.) et MOUSTARDIER (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 23.
  - [7] EPSTEIN (W.), JOHNSON (A.) et RAGAN (Ch.). *Proceed. Soc. exp. Biol.*, 1956, **91**, 235.
-



# **PRÉSENCE DANS LES IMMUNSÉRUMS ANTI-BACTÉRIENS DE FACTEURS ANTI-GLOBULINIQUES ANALOGUES A CEUX DE LA POLYARTHRITE CHRONIQUE ÉVOLUTIVE**

par A. EYQUEM, N. GUYOT-JEANNIN et L. PODLIACHOUK (\*).

*(Institut Pasteur, Laboratoire d'Hématologie  
et des Groupes sanguins)*

Il existe dans le sérum de certains malades atteints de polyarthrite chronique évolutive (P. C. E.), une macro-globuline, dont les caractères sérologiques ont été précisés [6, 7, 8]. Cette protéine est capable de se combiner avec les complexes antigène-anticorps; elle est notamment révélabale à l'aide de globules rouges sensibilisés par un immunsérum de lapin. Cette macro-globuline a une constante de sédimentation  $S_{20}^w$  de 22, elle est dissociable en deux composants de constante 19 S et 7 S [5]. Elle possède aussi la propriété de se combiner avec la globuline d'origine humaine, fraction F II de Cohn; cette combinaison peut être révélée par la réaction de précipitation (Epstein) ou d'hémagglutination passive [1], en fixant la globuline sur les globules rouges tannés [3, 6, 7]. Cette dernière réaction est très sensible et permet de déceler une activité dans le sérum de P. C. E. dilué souvent au 1/800 ou à 1/3 200.

Le mode de formation et l'étiologie de cette macro-globuline restent inconnus. Certaines des observations que nous avons faites nous permettent d'envisager une hypothèse. En effet, les différents échantillons de fractions F II obtenus par la méthode 6 + 9 de Cohn, ne sont pas tous directement utilisables dans la réaction sérologique. Certains fournissent des résultats qualitativement satisfaisants en étant mis simplement en dilution, tandis que d'autres, fixés sur les globules tannés, dans les mêmes conditions, sont absolument inaptes à déceler une anomalie quelconque dans le sérum de P. C. E. Par contre, ils le peuvent, au moins pour certains d'entre eux, après chauffage

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

pendant trente minutes à 63° ou même à 56°, ou encore après traitement par le formol. Il convient de remarquer que la qualité de l'agglutination est parfois un peu différente de celle observée avec les échantillons de globulines réagissant sans traitement préalable. Les principaux échantillons de globuline étudiés réagissant sans traitement préalable sont les suivants :

- 1° Fourni par la Croix-Rouge Néerlandaise (en 1954),
- 2° Harvard Medical School Boston, échantillon identique à celui étudié par Heller [6],
- 3° Squibb 601 et 606,
- 4° Squibb 658,
- 5° Protein Foundation 1014.

Lors de notre séjour à la Protein Foundation, nous avons étudié systématiquement un nombre important d'échantillons de fractions II, obtenus chaque semaine à partir du plasma de sang fraîchement prélevé, et nous avons pu constater l'absence de réactivité de ces échantillons ; seul l'échantillon 1014 nous a donné des résultats satisfaisants. Cet échantillon provenait du fractionnement d'un lot de plasma qui avait été conservé à 4°, pendant une douzaine de semaines environ.

Les échantillons 601 et 606 de Squibb, étudiés indépendamment par nous-mêmes [3] et Kunkel [5], ainsi que par Singer et Plotz [12] fournissaient des résultats aussi nets sans traitement préalable. Ils étaient inaptes à l'utilisation thérapeutique. On pouvait donc se demander si ces échantillons n'avaient pas été soumis à une contamination bactérienne, au cours de leur manipulation. Ils pouvaient ainsi mettre en évidence un anticorps anti-bactérien, existant dans le sérum de P. C. E., peut être différent du facteur de Waaler-Rose.

Si la réaction était attribuable à une contamination bactérienne, on devrait mettre en évidence sa positivité dans le sérum d'autres malades ; or, parmi ceux ayant donné un résultat positif, nous n'avons trouvé que des lupus érythémateux et quelques cancéreux. (Notons qu'il n'y a qu'un nombre relativement limité de malades qui possèdent un anticorps vis-à-vis de globules rouges tannés.)

Pour préciser l'éventuelle contamination bactérienne, nous pouvions effectuer deux séries d'expériences :

1° Absorber le facteur de Waaler-Rose à l'aide de différentes bactéries ou antigènes bactériens, mais la spécificité des résultats pouvait être critiquée, car l'absorption du facteur pouvait être secondaire à une première sensibilisation par un anticorps spécifique.

2° Nous pouvions, au contraire, plus facilement rechercher la présence dans le sérum de différents lapins, immunisés à l'aide

d'antigènes bactériens, l'existence de l'anticorps se combinant avec les globulines, par la réaction d'hémagglutination passive.

Nous avons ainsi examiné : 190 lapins, 45 chevaux, 10 bœufs, 12 chiens.

Parmi les immunsérums de lapin, nous avons :

Lapin anti-*Salmonella* (D<sup>r</sup> Le Minor).

Lapin anti-pneumocoque.

Lapin anti-staphylocoque (D<sup>r</sup> Pillet).

Lapin anti-streptocoque (D<sup>r</sup> Wahl).

Lapin anti-anaérobie (D<sup>r</sup> Prévot).

Ces deux derniers groupes nous ont fourni des résultats inattendus. En effet, le sérum de lapins ayant reçu des injections de suspension de streptocoques présente une substance réagissant, par hémagglutination passive, avec l'échantillon 1014 de globuline (tableau I).

TABLEAU I. — Réactions d'hémagglutination passive obtenues avec le sérum de lapins anti-streptocoque A et la globuline 1014.

N <sup>o</sup>	TITRES									
	7	14	28	56	112	224	450	900	1800	3600
694	++++ —	++++ —	++++ —	+++ —	+++ —	+	+	+	+	
795	++++ —	++++ —	++++ —	++ —	++ —	++	+	+	+	+
803	+++ —	+++ —	+++ —	+++ —	++ —	++				
961	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	+++ —	+++	+++	+++	+++	+++
962	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	+++	+++	+++	++	++
974	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++	++	++	++	++
988	++++ +	++++ +	++++ —	+++ —	+++ —	+	+			
987	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
990	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++	+++	+++	+++	—
993	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
994	+++ —	+++ —	+++ —	+	— —	— —	— —	— —	— —	— —
789 R	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++	++	++	—	—
791 R	+++ —	+++ —	+++ —	+++ —	+++ —	++	—	—	—	—
796 R	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++	++	++	—	—
797 R	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
798 R	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	++				

Elle se retrouve avec d'autres échantillons de globulines (601, 606) réagissant sans traitement préalable avec le sérum de P. C. E. On pourrait donc penser à une contamination des globulines par une bactérie ayant une communauté antigénique avec

TABLEAU II. — Comparaison de l'activité du sérum de lapins anti-streptocoque A vis-à-vis de deux types de globuline  $\gamma$ .

gib. $\gamma$ 1014	TITRES						gib. $\gamma$ Bern chauffé	TITRES					
	7	14	28	56	100	200		7	14	28	56	100	200
537	+++	+++	++	++	+		537	+++	+++	+			
566	—						566	—					
569	++	++	+				569	+	+				
571	—						571	+					
684	+++	++++	+++	+++	+++	+++	684	+++	+++	+++	+++	+++	+++
685	+++	++++	++++	++++	+++	++	685	+++	++++	+++	+++	++	++
737	+++	+++	+++	+++	++	+	737	+++	++	+++	+++	++	++
755	+++	++++	+++	++	++		755	+++	+++	++	++		
756	+++	+++	+++	+++	++		756	+++	+++	++	++	+	
757	+++	++	++	++			757	+++	+++	+++	++	+	
759	++	+	+				759	++	++				
800	+++	+++	+++	+++	++		800	+++	+++	++	++	+	
807	—						807	+	+				
808	++	+	+++	+			808	++	++				
839	+++	++++	++++	+++	+++	++	839	+++	++++	+++	+++	+++	++
573	—						573	—					
595	—						595	—					

(Pour chaque sérum, deux séries de résultats sont indiquées : à la ligne supérieure vis-à-vis de G. R. tannés et sensibilisés, et à la ligne inférieure vis-à-vis de G. R. tannés non sensibilisés.)

le streptocoque : mais, fait important, la réaction se produit aussi vis-à-vis de la globuline suisse (aimablement fournie par M. Hassig) et soumise au chauffage à 56° pendant trente minutes (tableau II), ou encore la globuline de la Croix-Rouge hollandaise ou un échantillon « R » très particulier (fourni par M. Grabar).

Le facteur mis en évidence dans le sérum de lapins anti-streptocoques apparaît après une immunisation de cinq semaines ayant comporté 15 injections. Il se retrouve à peu près exclusivement chez les lapins immunisés avec le streptocoque hémolytique A et notamment les types antigéniques suivants : 1, 2, 3, 5, 6, 8, 13, 18, 19, 23, 24, 26, 36 et 46.

Nous ne l'avons pas encore décelé après immunisation vis-à-vis des types 12, 14, 27, 28, 31.

Il convient de noter que, parmi les lapins d'une même série, immunisés suivant le même rythme et dans les mêmes conditions vis-à-vis du même type antigénique, tous ne sont pas capables d'élaborer le facteur.

Les antigènes streptococciques de groupe ne semblent pas responsables de cette immunisation : les immun sérums de lapins anti-B, E, F, H, K, L, O, P, Q nous ont fourni des résultats négatifs. Seul le groupe C nous a donné un résultat positif.

Le facteur anti-globulinique est indépendant des anticorps anti-streptococciques spécifiques.

L'examen de 7 bovins anti-streptococciques A nous a montré, chez trois d'entre eux, l'existence d'un facteur agglutinant de manière qualitativement différente, il est vrai, les globules sensibilisés par la globuline  $\gamma$ .

Le même facteur se retrouve dans le sérum de lapin immunisé vis-à-vis de bactéries anaérobies, notamment *Corynebacterium pyogenes*, *liquefaciens* ou *diphtheroides*, ou encore *Sphaerophorus pseudo-necrophorus*, *ridiculosus* ou *Fusiformis biaculus* (tableau III).

Il faut remarquer de même, que pour les sérums anti-streptocoques, tous les lapins d'une même série, soumis au même protocole d'immunisation n'élaborent pas le même facteur. Dans le cas des lapins anti-anaérobies, l'anti-globuline est décelable avec les globulines 1014, 601 et 606, non chauffées ainsi que les globulines suisses, hollandaises ou R chauffées à 56° pendant trente minutes. Le facteur anti-globulinique n'est pas décelable vis-à-vis de ces mêmes échantillons non chauffés.

Pour certains sérums possédant un titre d'anti-globuline important à la réaction d'héماغglutination, on observe une réaction de précipitation interfaciale, avec constitution du précipité.

Dans la majorité des cas, la réaction de Waaler-Rose modifiée s'est révélée négative lorsqu'elle a été pratiquée à l'aide de glo-



TABLEAU III. — Réactions d'hémagglutination passive obtenues avec le sérum de lapins anti-streptocoque (B, E, H, K, L, P, Q) et de bovins anti-streptocoque A, vis-à-vis de la globuline 1014.

		TITRES									
		7	14	28	56	112	224	450	900	1800	3600
LAPINS ANTI-STREPTO.	B	—	+	±	+	—	—	—	—	—	—
	C	++++	++++	++++	—	++	+	+	—	—	—
	E	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	H	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	L	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—
	O	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	P	++	++	++	+	—	—	—	—	—	—
	Q	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
BOVINS ANTI-STREPTO A	10	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—
	24	++++	++++	++++	++++	++	++	++	++	++	++
	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
	88	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	89	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
	91	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+

bules rouges humains sensibilisés par un sérum de lapin anti-homme. Elle est, par contre, positive dans un tiers des cas vis-à-vis de globules rouges de mouton sensibilisés par un anti-sérum de lapin. Ceci peut être attribué à une absorption du facteur lors de l'élimination des agglutinines anti-homme réalisée préalablement à l'examen des sérums de lapins.

Le facteur anti-globulinique du sérum des lapins anti-streptococciques est aussi décelable par les globulines de bœuf, de porc (fraction II de Armour), comme l'est celui des P. C. E., ainsi que par les globulines de lapins obtenues par fractionnement à l'aide de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  par agglutination de particules de latex sensibilisées.

L'ultracentrifugation du sérum de certains lapins, à 40 000 *g* pendant trois heures effectuée comparativement à celle du sérum de P. C. E., réalise une certaine concentration du facteur dans les couches inférieures du tube.

La mise en évidence, chez les lapins immunisés, de ce facteur

anti-globulinique, suggère de nombreuses hypothèses. On doit tout naturellement le rapprocher de l'immuno-conglutinine qui, selon Coombs [2] doit être considérée comme un anticorps anti-complément ; son activité se limiterait à un complément adsorbé sur un complexe antigène-anticorps, notamment chez des animaux immunisés vis-à-vis de bacilles Gram-négatifs et soumis à une stimulation suffisamment intense. Le complément subirait, après fixation sur le complexe antigène-anticorps, une modification de l'immuno-conglutinine. Ce facteur ne semble pas identique aux anticorps décrits antérieurement [9, 10].

Le facteur anti-globulinique pourrait donc ne réagir qu'avec les groupements de la globuline rendus apparents au cours de la préparation de certains échantillons ou démasqués par le chauffage à 56°. La comparaison de l'activité des hétéro-immunsérums anti-globuliniques et des facteurs permet de penser que ces derniers ne réagissent qu'avec une partie des groupements antigéniques, car la réaction n'est obtenue que lorsqu'une forte quantité de globuline est fixée sur les globules rouges tannés.

Ainsi les facteurs anti-globuliniques, mis en évidence dans les immunsérums anti-bactériens, permettent de supposer que ce type d'immunisation faisant intervenir les antigènes streptococciques ou des bactéries anaérobies pourrait être à l'origine de la formation d'une macro-globuline, au cours de la P. C. E.

#### CONCLUSION.

Il existe, au cours de la P. C. E., un facteur décelable à l'aide de certaines globulines (fractions F II) ; sans traitement préalable, ce même facteur peut être mis en évidence à l'aide d'autres globulines soumises au chauffage à 63° ou à 56°.

Le sérum de certains lapins immunisés à l'aide de streptocoques, de différents types antigéniques ou de bactéries anaérobies pendant plus de trois semaines, possède un facteur anti-globulinique ayant des caractères analogues à ceux observés dans la P. C. E. Il est parfois associé à un facteur de Waaler-Rose.

Ce facteur anti-globulinique réagit avec les globulines d'origine spécifique différente.

#### SUMMARY

##### PRESENCE IN ANTI-BACTERIAL SERA OF ANTI-GLOBULINIC FACTORS RESEMBLING THOSE OF RHEUMATOID ARTHRITIS.

The serum of patients suffering from rheumatoid arthritis contains a factor which can be demonstrated by means of certain F II globulin fractions. This factor can be demonstrated by means of other globulins heated to 63° or 56°.

The serum of certain rabbits which have been immunized during more than three weeks with : a) different types streptococci ; b) anaerobic bacteria, contains an anti-globulin factor, possessing properties resembling those of rheumatoid arthritis sera ; this factor is sometimes associated with the Waaler-Rose factor. This anti-globulin factor reacts with globulins of various species.

\*  
\* \*

Nous tenons à remercier, pour nous avoir fourni différents échantillons de globuline, le Dr S. Gibson (Am. Red. Cross), le Dr Pennell (Protein Foundation Harvard), le médecin général Julliard (C. T. R. A.), le Dr Van Loghem, le Dr Hassig, le Dr J.-P. Soulier ; pour les immunsérums de lapins, nos collègues les Dr<sup>ss</sup> Wahl, Prévot, Pillet et Le Minor. Les sérums de malades atteints de rhumatismes inflammatoires chroniques nous ont été confiés par le Dr F. Jacqueline.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BORDUAS (A.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 34.
- [2] COOMBS (A. M.) et COOMBS (R. R. A.). *J. Hyg.*, 1953, **51**, 509.
- [3] EYQUEM (A.), PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.) et JACQUELINE (F.). *VI<sup>e</sup> Congrès Soc. Europ. Hémat.*, Karger, édit., 1958, 900.
- [4] EYQUEM (A.), GUYOT-JEANNIN (N.) et PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.). *Colloque Immunopathol. Seelisberg*, 1958 (sous presse).
- [5] FRANKLIN (E. C.), HOLMAN (H. R.), MÜLLER-EBERHARDT et KUNKEL (H. G.). *J. exp. Med.*, 1957, **105**, 425.
- [6] HELLER (G.), JACOBSON (A. S.), KOLODNY (M. H.) et KAMMERER (W. H.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 66.
- [7] JACQUELINE (F.), EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.). *Rev. Rhum.*, 1957, **24**, 385.
- [8] JOCHEM (E.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 625.
- [9] LILLE-SZYSZKOWICZ (I.) et GULMANTOWICZ (A.). *Vox sang.*, 1958, **3**, 100.
- [10] MILGROM (F.) et DUBISKI (S.). *Nature*, 1957, **179**, 1351.
- [11] PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **94**, 659.
- [12] SINGER (J. M.) et PLOTZ (C. M.). *Am. J. Med.*, 1956, **21**, 888.

# ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE SUR LES SALMONELLA

## V. — RÔLE DE QUELQUES SUCRES, ET EN PARTICULIER DES 3-6 DIDÉSOXYHEXOSES, DANS LA SPÉCIFICITÉ DES ANTIGÈNES O DU TABLEAU DE KAUFFMANN-WHITE (\*)

par A. M. STAUB, R. TINELLI, O. LÜDERITZ et O. WESTPHAL (\*\*)  
(avec la collaboration technique de B. LELUC).

(Service des Vaccins, Institut Pasteur, Paris,  
et Wander Forschungsinstitut, Freiburg, Allemagne)

Au cours de ces derniers mois, nous avons montré l'existence dans les *Salmonella* de quatre nouveaux sucres (didésoxyhexoses) : au tyvélose [31, 41] et à l'abéquose [32, 41] découverts précédemment se sont ajoutés, en effet, deux autres sucres nouveaux que nous avons appelés paratose [6, 8] et colitose [25]. Dans un travail en collaboration avec M. Lederer, M<sup>mes</sup> Fouquet et Polonsky et M. Stirm, la nature exacte de ces quatre sucres a été déterminée et la synthèse de certains réalisée [7, 8]. Nous voudrions montrer dans ce travail le rôle de ces sucres, ainsi que celui du glucose et du rhamnose dans la spécificité des antigènes (1) O de Kauffmann-White auxquels ils appartiennent. L'utilisation des deux techniques de l'inhibition spécifique, qui permet de déterminer le sucre terminal d'une chaîne polyosidique, et de la précipitation croisée par des polyosides de constitution connue, avait déjà permis d'apporter les premières notions sur la structure chimique des antigènes 9 et 12 de *S. typhi* [36]. Nous avons appliqué les mêmes techniques dans ce travail, dans lequel nous avons repris l'étude des antigènes 9 (présent dans les *Salmonella* du groupe D) et 12 (présent dans les *Salmonella* des groupes A, B et D) en utilisant d'autres sérums, et où nous avons abordé celle des antigènes 1 (présent dans certaines *Salmonella* des groupes A,

(\*) Une partie des résultats publiés dans ce mémoire a fait l'objet de trois communications aux Congrès de Stockholm et de Vienne [36 a].

(\*\*) Manuscrit reçu le 12 novembre 1958.

(1) Bien que l'on sache [33] que les « antigènes » de Kauffmann-White peuvent être en réalité des groupements déterminants portés par une même molécule, nous continuons à utiliser cette appellation courante.

B et E<sub>4</sub>), 2 (présent dans les *Salmonella* du groupe A), 4 (présent dans les *Salmonella* du groupe B), 8 (présent dans les *Salmonella* du groupe C<sub>2</sub>) et 35 (présent dans les *Salmonella* du groupe P et *E. coli* O 111 : B<sub>4</sub>).

Le tableau I indique les *Salmonella* utilisées dans chaque groupe, les antigènes O de Kauffmann-White qu'elles contiennent et les sucres présents dans les polyosides spécifiques qui ont servi pour cette étude ; ces polyosides portent des groupes déterminants responsables en grande partie de la spécificité des antigènes O [34].

TABEAU I. — Caractéristiques immunologiques et chimiques des germes utilisés pour cette étude.

Groupe	Salmonella	Antigènes O (de KAUFF- MANN-WHITE) (x)	Sucres présents dans le polyoside								
			Hexoses			6 Dés- oxy- hexoses	3-6 Didés- oxy- hexoses				
			Galactose	Glucose	Mannose		Rhamnose	Abéquose	Colitose	Paratose	Tyvélose
A	S.paratyphi A " var.durazzo	1,2,12 <u>2</u> ,12	+	+	+	+				+	
B	S.paratyphi B S.typhi murium	1,4,5,12 (1) <u>4</u> ,12	+	+	+	+		+			
C <sub>2</sub>	S.newport	6, <u>8</u>	+	+	+	+		+			
D	S. typhi	<u>2</u> ,12	+	+	+	+					+
E <sub>4</sub>	S. niloese	1,3, <u>19</u>	+	+	+	+					
P	S. adelaide	<u>35</u>	+	+						+	
E. coli O 11f B <sub>4</sub>			111	+	+					+	

(x) = Les chiffres soulignés représentent les antigènes spécifiques de chaque groupe.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

SOUCHES. — Les souches suivantes proviennent du Centre des *Salmonella* de l'Institut Pasteur, où elles sont conservées sur milieu à l'œuf (milieu de Dorset [*in* 3]). Elles ont été entraînées avant chaque récolte par un passage en bouillon de viande et un passage sur gélose nutritive suivi d'un isolement.



*S. typhi* : souche T35-52 isolée à l'Institut Pasteur, ne contenant que l'antigène O ;

*S. paratyphi* B : souche du Centre International des *Salmonella* n° 8006.

*S. typhi murium* : 2-56, souche isolée à l'Institut Pasteur.

*S. paratyphi* A : 205, variante aflagellée de l'Institut Pasteur.

*S. adelaide* : souche du Centre International des *Salmonella*.

Les autres souches de *Salmonella* provenaient du N. C. T. C. de Londres et portaient les numéros suivants :

*S. paratyphi* A var. *durazzo* N. C. T. C. 3175.

*S. newport* N. C. T. C. 3751

*S. niloese* N. C. T. C. 5789.

La souche de *E. coli* O 111 : B4 provenait du Centre International des *Salmonella* de Copenhague.

SÉRUMS. — Nous avons utilisé des sérums de cheval et de lapin préparés suivant le protocole indiqué par Staub et Davarpanah [34]. Tous les chevaux ont reçu deux séries de 8 injections bihebdomadaires, séparées par un intervalle de quarante-cinq jours. Les lapins ont reçu 2 ou 3 séries de 8 injections à raison de 4 par semaine, à un mois d'intervalle. Les sérums de lapin sont toujours des mélanges de sérums provenant de 3 à 6 animaux.

POLYOSIDES. — Les polyosides de *S. typhi*, *S. paratyphi* B, *S. typhi murium*, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* A var. *durazzo* et *S. adelaide* ont été extraits par hydrolyse acétique des germes (cultivés sur gélose nutritive, lavés et séchés par l'acétone), puis purifiés suivant la technique de Freeman [40], dialysés et lyophilisés. Les précipitations préconisées par Freeman (6 précipitations alcooliques fractionnées entre 1 et 6 volumes ; 3 précipitations par l'acide acétique glacial de 94 à 98 p. 100 suivant les polyosides ; 3 dernières précipitations alcooliques entre 1 et 6 volumes) nous ont donné de bons résultats pour les polyosides des quatre premières *Salmonella*. Avec les polyosides extraits de *S. adelaide* et *S. paratyphi* A var. *durazzo*, la précipitation acétique entraînant des pertes du polyoside, nous n'avons procédé qu'à deux (var. *durazzo*) et même une seule précipitation (*adelaide*).

Les polyosides de *S. niloese* et de *S. newport* nous ont été donnés par D. A. L. Davies. Ils avaient été préparés à partir de l'antigène somatique et n'avaient pas été hautement purifiés [5]. Nous avons employé tel quel le polyoside de *S. niloese*. Le polyoside de *S. newport* a été purifié suivant la technique exacte de Freeman [40].

Le polyoside de *E. coli* a été préparé à partir du lipopolyoside extrait des germes par le mélange phénol/eau à chaud [40]. Après hydrolyse par l'acide acétique normal pendant une heure à 100°, le polyoside a été précipité par l'alcool, dialysé puis lyophilisé.

INHIBITION SPÉCIFIQUE. — Nous avons suivi exactement la technique décrite par Staub et Tinelli [36] en utilisant 4 mg de chaque 3-6 di-désoxyhexose et 40 mg des autres sucres. Toutefois, au lieu d'utiliser toujours 0,5 cm<sup>3</sup> de sérum, nous avons choisi pour chaque sérum la

quantité contenant environ 100  $\mu$ g d'azote précipitable par le polyside au maximum de la précipitation, et nous avons utilisé la quantité de polyside nécessaire et suffisante pour précipiter cette quantité d'anticorps.

AGGLUTINATION. — Nous avons utilisé la technique classique : 0,9 cm<sup>3</sup> de suspension O ( $5 \times 10^8$  germes tués par l'alcool à 50 p. 100) et 0,1 cm<sup>3</sup> de dilutions de sérum allant du 1/10, 1/20, 1/40... jusqu'à 1/2 500. La lecture a été faite après centrifugation. Le titre est indiqué par l'inverse de la dilution la plus forte donnant une agglutination nette ou suspecte ( $\pm$ ). L'absorption des sérums se fait sur culot de germes, chauffés à 100° pendant deux heures, puis lavés par de la solution physiologique. On utilise la récolte d'une boîte de Roux pour absorber 1 cm<sup>3</sup> de sérum au 1/10 ; on laisse en contact sérum et germes deux heures à 37°, puis la nuit à la température du laboratoire.

OXYDATION DES POLYSIDES PAR L'ACIDE PERIODIQUE. — L'acide periodique ne détruit que les sucres qui ont des groupements OH adjacents [4]. Cette oxydation a toujours été effectuée à 0° à l'obscurité au moyen d'un excès d'oxydant [38]. L'oxydation est arrêtée lorsque la courbe de la consommation d'acide periodique a atteint un plateau. Après dialyse à l'obscurité et lyophilisation, les polysides oxydés se conservent bien à l'état sec ; ils sont toutefois souvent difficiles à dissoudre. Il faut chauffer quelques instants leur suspension au bain-marie bouillant pour obtenir une solution limpide.

OBTENTION DES 3-6-DIDÉSOXYHEXOSES. — Les lipopolysides extraits des germes par le mélange phénol/eau à chaud [40] et ultracentrifugés sont hydrolysés pendant six minutes à 100° par SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, N. Après neutralisation par la baryte et concentration du liquide, les 3-6-didésoxyhexoses sont séparés de l'hydrolysât par chromatographie sur colonne de cellulose au moyen d'un mélange eau-acétone (5 : 95).

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

### A. — EXPÉRIENCES D'INHIBITION.

a) *Antigènes 9 et 12 du polyside extrait de S. typhi (groupe D) : rôles du tyvélose (3-6 didésoxy-D-mannose) [7] du rhamnose et du glucose.*

Pour cette étude, nous avons utilisé un sérum de lapin et deux sérums de cheval anti-*S. typhi* dont l'un, le sérum n° 1, est celui qui nous a fourni les résultats de la précédente étude [36].

Nous avons précipité chacun de ces sérums par chacun des polysides suivants : le polyside extrait de *S. typhi* (PsTy des tableaux II et III), qui contient des groupement déterminants des antigènes 9 et 12 et qui est constitué par du glucose, du galactose, du mannose, du rhamnose et du tyvélose ; le même polyside oxydé par l'acide periodique

(PsTy<sub>ox</sub> des tableaux II et III), qui ne contient plus que des groupements déterminants de l'antigène 9 (2) et dont les sucres consti-

TABLEAU II. — Précipitation des sérums anti-*S. typhi*. % d'inhibition obtenus avec divers sucres.

Sucre inhibiteur	Sérum de cheval anti <i>S. typhi</i> n° 1			Sérum de cheval anti <i>S. typhi</i> n° 2			Sérum de lapin anti <i>S. typhi</i>		
	précipité par Ps Ty (12, 9) Ps Ty <sub>ox</sub> (9) Ps Pt B (12)			précipité par Ps Ty (12, 9) Ps Ty <sub>ox</sub> (9) Ps Pt B (12)			précipité par Ps Ty (12, 9) Ps Ty <sub>ox</sub> (9) Ps Pt B (12)		
Glucose	3	2	3	7	6	21	58	très petit précipité	
Galactose	5	0	3	0	4	14	25		
Mannose	4	10	0	6	11	13	19		
Ruannose	23	2	85	6	6	20	11		
Tyvélose	27	66	0	14	38	0	7		

PsTy = Polyoside extrait de *S. typhi* (glucose, galactose, mannose, rhamnose et tyvélose). PsTy<sub>ox</sub> = Polyoside extrait de *S. typhi* oxydé par l'acide périodique (galactose, mannose et tyvélose). PsPtB = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B (glucose, galactose, mannose, rhamnose et abéquose). (9, 12); (9); (12) = Antigènes O du tableau de Kaufmann-White présents sur le polyoside et responsables de la précipitation dont l'inhibition est étudiée dans cette colonne. Le chiffre souligné (9) correspond à l'antigène propre au groupe D auquel appartient *S. typhi*.

(2) En réalité, les groupements correspondant à la fraction 12<sub>a</sub> de l'antigène 12, présents dans *S. typhi* et absents de *S. paratyphi* B, ne sont pas détruits [36], mais les anticorps correspondants sont si peu nombreux dans nos sérums qu'on peut ne pas en tenir compte.

TABLEAU III. — Comparaison entre les activités inhibitrices des différents didésoxyhexoses sur la précipitation des sérums anti-*S. typhi* par le polyoside extrait de *S. typhi*.

Sucre inhibiteur	% inhibition de la précipitation obtenue avec le sérum de cheval anti <i>S. typhi</i>			
	n° 1		n° 2	
	et		et	
	Ps Ty (12,2)	Ps Ty <sub>ox</sub> (9)	Ps Ty (12,2)	Ps Ty <sub>ox</sub> (9)
Tyvélose	27	57	14	38
Abéquose	3,5	—	—	0
Colitose	3	—	—	3
Ascarylose	0	—	—	—
Paratose	0	—	—	1
3,6 didésoxy-D-mannose (Tyvélose synthétique)	—	68	—	—

Cf. les notes explicatives en bas du tableau II.

tutifs sont le galactose, le mannose et le tyvélose [36] ; le polyoside extrait de *S. paratyphi* B (PsPt B du tableau II) sur lequel seuls les groupements déterminants de l'antigène 12 (Cf. tableau I) sont capables de réagir avec les sérums anti-*S. typhi* qui contiennent les anticorps anti-9 et anti-12 ; ce polyoside contient du glucose, du galactose, du mannose, du rhamnose et de l'abéquose.

Les résultats obtenus avec le sérum de cheval anti-*S. typhi* n° 1, rappelés dans le tableau II, avaient permis de conclure à la position terminale du tyvélose sur l'antigène 9 et du rhamnose sur l'antigène 12 [36].

On voit sur le même tableau II que le sérum de lapin nous a fourni des résultats tout à fait différents de ceux obtenus précédemment avec le sérum de cheval n° 1 : alors qu'avec celui-ci le tyvélose et le rhamnose inhibaient seuls la précipitation du polyoside typhique (PsTy du tableau II), cette fois-ci, ce sont ces deux sucres qui inhibent le moins cette précipitation ; le glucose est de beaucoup le plus actif. Il ne nous a pas été possible de travailler avec le polyoside oxydé qui précipite trop faiblement ce sérum pour qu'on puisse étudier l'inhibition quantitative de cette précipitation. Par contre, le polyoside paratyphique B (PsPtB du tableau II) donne un précipité faible mais dosable : sur cette précipitation le glucose est encore plus actif

que sur la précipitation du polyoside homologue. Il faut donc conclure que l'antigène 12, commun aux *Salmonella typhi* et paratyphi B, doit contenir une chaîne terminée par du glucose en plus de celle terminée par le rhamnose.

Les résultats obtenus avec le sérum de cheval n° 2 sont intermédiaires entre les précédents. Le tyvélose inhibe la précipitation par le polyoside typhique oxydé (PsTy<sub>ox</sub> du tableau II). Le rhamnose et le glucose inhibent un peu plus fortement que les autres sucres la précipitation par le polyoside hétérologue (PsPtB du tableau II).

La spécificité de l'inhibition obtenue avec le tyvélose naturel ou synthétique ressort de l'examen du tableau III sur lequel on voit que tous les autres 3-6 didésoxyhexoses sont inactifs.

b) *Antigènes 4 et 12 du polyoside de S. paratyphi B (groupe B)* : rôles de l'abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose) [7] et du rhamnose.

Nous avons travaillé avec deux sérums de cheval et un sérum de lapin anti-*S. paratyphi* B que nous avons précipités par les polyosides suivants : le polyoside de *S. paratyphi* B (PsPtB des tableaux IV, V et VI) qui contient des groupements déterminants des antigènes 4, 5 et 12 et qui est constitué par du glucose, du galactose, du mannose, du rhamnose et de l'abéquose ; le même polyoside oxydé par l'acide periodique (PsPtB<sub>ox</sub> des tableaux IV et VI) qui ne contient plus que des groupements déterminants de l'antigène 4 [36] (et peut-être de l'antigène 5) et qui est constitué par du galactose, du mannose et de l'abéquose [38] ; le polyoside de *S. typhi* (Psty du tableau IV) sur lequel seuls les groupements déterminants de l'antigène 12 sont capables de réagir avec les sérums anti-*S. paratyphi* B qui contiennent les anticorps anti-4, anti-5 et anti-12.

ANTIGÈNE 4. — On voit (tableau IV) que l'abéquose inhibe la précipitation des deux sérums de cheval par le polyoside paratyphique B (PsPtB du tableau IV), et surtout par ce polyoside oxydé (PsPtB<sub>ox</sub> du tableau IV). Il doit donc se trouver en position terminale sur l'antigène 4, ou l'antigène 5. Le fait qu'on trouve de l'abéquose dans toutes les *Salmonella* du groupe B étudiées jusqu'ici [21] (contenant toutes l'antigène 4 mais pas toutes l'antigène 5) suggérerait fortement que l'abéquose ne jouait aucun rôle dans l'antigène 5. Toutefois, pour nous en assurer, nous avons d'abord étudié l'activité de l'abéquose sur la précipitation du sérum n° 1 par le polyoside extrait d'une souche de *S. typhi murium* (PsTm du tableau V) ne contenant pas d'antigène 5 : on constate une inhibition très nette (tableau V). Nous avons ensuite éliminé de ce même sérum les anticorps précipitables par le polyoside extrait de *S. typhi murium* et étudié l'activité de l'abéquose sur la précipitation des anticorps restants par le polyoside



TABLEAU IV. — Précipitation des sérums anti-*S. paratyphi* B. % d'inhibition obtenus avec divers sucres.

Sucre inhibiteur	Sérum de cheval anti <i>S. paratyphi</i> B n° 1			Sérum de cheval anti <i>S. paratyphi</i> B n° 2			Sérum de lapin anti <i>S. paratyphi</i> B		
	précipité par.			précipité par			précipité par		
	Ps PtB (4, 5, 12)	Ps PtB ox (4) ox	Ps Ty (12)	Ps PtB (4, 5, 12)	Ps PtB ox (4) ox	Ps Ty (12)	Ps PtB (4, 5, 12)	Ps PtB ox (4) ox	Ps Ty (12)
Glucose	4	4	16	4	0	5	9	5	
Galactose	4	8	24	4	1	0	7	5	
Mannose	4	6	25	0	1	7	4	1	
Rhamnose	2	5	27	4	1	28	7	3	
Abéquose	36	52	-	11	21	2	5	6	
									Très petit précipité

PsPtB = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B (glucose, galactose, mannose, rhamnose, abéquose). PsPtB<sub>ox</sub> = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B oxydé par l'acide periodique (galactose, mannose, abéquose). PsTy — Polyoside extrait de *S. typhi* (glucose, galactose, mannose, rhamnose, tyvélose). (4, 5, 12) ; (12) = Antigènes O du tableau de Kauffmann-White présents sur le polyoside et responsables de la précipitation dont l'inhibition est étudiée dans cette colonne. Le chiffre souligné (4) correspond à l'antigène propre au groupe B auquel appartient *S. paratyphi* B.

TABLEAU V. — % d'inhibition des précipitations des anticorps 4 et 5 du sérum de cheval anti-*S. paratyphi* B n° 1 par les différents sucres.

Précipitation par	Sucres inhibiteurs				
	Abéquose	Rhamnose	Mannose	Galactose	Glucose
Ps Tm (4, 12)	27	7	0	8	2
Ps PtB (4, 5, 12)	36	2	4	4	4
Ps PtB (4, 5, 12) après élimination des anticorps 4 et 12	4	—	—	—	—

PsTm = Polyoside extrait de *S. typhi murium* contenant les antigènes O 4 et 12 du tableau de Kauffmann-White. PsPtB = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B contenant les antigènes O 4, 5 et 12 du tableau de Kauffmann-White.

TABLEAU VI. — Comparaison entre les activités inhibitrices des différents didésoxyhexoses sur la précipitation des sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B par le polyoside extrait de *S. paratyphi* B.

Sucre inhibiteur	% inhibition de la précipitation obtenue avec le sérum de cheval anti <i>S. paratyphi</i> B			
	n° 3		n° 4	
	et		et	
	Ps PtB (4, 12)	Ps PtB <sub>ox</sub> (4)	Ps PtB (4, 12)	Ps PtB <sub>ox</sub> (4)
Abéquose (groupe B)	36	52	11	30
Abéquose (groupe C <sub>2</sub> )	—	44	—	36
Tyvélose	10	—	—	14
Ascarylose	0	—	—	—
Colitose	3, 4	13	—	9
Paratose	0	—	—	5
3, 6 didésoxy-D-galactose (abéquose synthétique)	—	48	—	32

Cf. les notes explicatives au bas du tableau IV.

paratyphique B : il n'y a pas d'inhibition (tableau V). C'est donc bien sur l'antigène 4 que se trouve en position terminale l'abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose). La spécificité de l'abéquose

naturel ou synthétique vis-à-vis des autres 3-6 didésoxyhexoses, dans cette inhibition, ressort de l'examen du tableau VI.

**ANTIGÈNE 12.** — La position terminale du rhamnose sur l'antigène 12 des polyosides typhique et paratyphique B se retrouve ici, puisque c'est le seul sucre capable d'inhiber la précipitation du sérum de cheval n° 2 par le polyoside typhique (PsTy du tableau IV). Les résultats obtenus pour cette même précipitation avec le sérum de cheval n° 1 sont beaucoup moins nets : les trois hexoses inhibant, eux aussi, la précipitation. On ne retrouve, toutefois, l'inhibition spécifique par le glucose des anticorps 12 du sérum de lapin anti-*S. typhi* (tableau II), ni avec ces sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B, ni avec le sérum de lapin avec lequel nous n'avons obtenu aucune inhibition nette par les cinq sucres simples constitutifs du polyoside extrait de *S. paratyphi* B (tableau IV).

c) *Antigènes 1, 2 et 12 du polyoside de S. paratyphi A (groupe A)* : rôles du glucose, du paratose (3-6 didésoxy-D-glucose) [8] et du rhamnose.

Nous avons travaillé avec un sérum de cheval et un sérum de lapin anti-*S. paratyphi* A et les deux sérums de cheval n° 1 anti-*S. paratyphi* B et anti-*S. typhi*. Comme polyosides nous avons utilisé :

1° Le polyoside de *S. paratyphi* A (PsPtA du tableau VII) qui contient des groupements déterminants des antigènes 1, 2 et 12 et qui est constitué par du glucose, du galactose, du mannose, du rhamnose et du paratose ;

2° Le même polyoside oxydé par l'acide periodique (PsPtA<sub>ox</sub> du tableau VII) qui contient du galactose, du mannose, du rhamnose, du paratose et des traces de glucose [38], mais dont la majeure partie des antigènes 1 et 12 ont été détruits et qui ne précipite plus du sérum de cheval que 60 p. 100 des anticorps précipitables par le polyoside non oxydé ;

3° Le polyoside de *S. paratyphi* A var. *durazzo* qui ne contient pas d'antigène 1 mais seulement des groupements déterminants des antigènes 2 et 12 ;

4° Le polyoside de *S. niloese* [antigènes 1, 3, 19] (PsNi du tableau VII) sur lequel seul l'antigène 1 est capable de réagir avec les sérums anti-*S. paratyphi* A qui contiennent les anticorps anti-1, anti-2 et anti-12.

**ANTIGÈNE 2.** — Quels que soient le sérum et le polyoside utilisés (extrait de *S. paratyphi* A ordinaire ou variante *durazzo*), il nous a été impossible d'obtenir une inhibition très significative avec le paratose. L'inhibition observée avec le polyoside de *S. paratyphi* A [7 p. 100] (PsPtA du tableau VII) est toutefois légèrement augmentée lorsqu'on utilise ce polyoside oxydé [11 p. 100] (PsPtA<sub>ox</sub> du tableau VII) ; mais nous n'avons pu

TABLEAU VII. — % d'inhibition des précipitations obtenues avec le polyside extrait de *S. paratyphi* A, et divers sérums homologues et croisés, ainsi qu'avec un sérum de cheval anti-*S. paratyphi* A et divers polysides précipitant ce sérum.

Sucre inhibiteur	Sérum de cheval anti <i>S. paratyphi</i> A précipité par				Sérum de lapin anti <i>S. paratyphi</i> A précipité par Ps PtA (1,2,12)	Sérum de cheval anti <i>S. typhi</i> précipité par Ps PtA (12)	Sérum de cheval anti <i>S. paratyphi</i> B précipité par Ps Pt A (12)
	Ps PtA (1,2,12)	Ps PtA (2) <sup>ox</sup>	Ps Ni (1)	Ps Ty (12)			
Glucose	16	11	37	8	—	4	8
Galactose	6	7	17	7	—	4	12
Mannose	5	6	20	7	—	1	16
Rhamnose	2	4	9	10	—	61	52
Paratose	7	11	—	—	10	—	—

PsPtA = Polyside extrait de *S. paratyphi* A (glucose, galactose, mannose, rhamnose, paratose). PsPtA<sub>ox</sub> = Polyside extrait de *S. paratyphi* A oxydé par l'acide periodique (galactose, mannose, paratose, rhamnose, traces de glucose. PsNi = Polyside extrait de *S. nitrore* (glucose, galactose, mannose, rhamnose) donnant une réaction croisée avec les sérums anti-*S. paratyphi* A. PsTy = Polyside extrait de *S. typhi* (glucose, galactose, mannose, rhamnose, tyvlose) donnant une réaction croisée avec le sérum anti-*S. paratyphi* A. (1, 2, 12); (2); (12) = Antigènes O du tableau de Kauffmann-White présents sur le polyside et responsables de la précipitation dont l'inhibition est étudiée dans cette colonne. Le chiffre souligné (2) correspond à l'antigène spécifique du groupe A auquel appartient *S. paratyphi* A.

dépasser 15 p. 100 d'inhibition même en utilisant jusqu'à sept fois plus de paratose. Ces chiffres ne suffiraient pas, par eux-mêmes, à affirmer la position terminale du paratose sur l'antigène 2 si sa rapide libération au cours de l'hydrolyse, sa présence dans les polyosides extrait de *S. paratyphi* A var. *durazzo* et *S. kiel* [21], qui possèdent l'antigène 2 et son absence des *Salmonella* ne contenant pas l'antigène 2 ne le suggéraient fortement.

ANTIGÈNE 12. — La position terminale du rhamnose sur l'antigène 12 du polyoside extrait de *S. paratyphi* A (PsPtA du tableau VII) ressort de l'inhibition par ce sucre de la précipitation des sérums anti-*S. typhi* et anti-*S. paratyphi* B par ce polyoside (tableau VII), puisque dans ces sérums, seuls les anticorps anti-12 sont précipitables par le polyoside de *S. paratyphi* A. On n'observe pas cette inhibition avec le sérum anti-*S. paratyphi* A.

ANTIGÈNE 1. — La position terminale du glucose sur l'antigène 1 ressort de l'inhibition par ce sucre des précipitations du sérum de cheval anti-*S. paratyphi* A par le polyoside extrait de *S. paratyphi* A et le polyoside extrait de *S. niloese* (tableau VII).

d) Antigène 35 du polyoside de *S. adelaide* (groupe P) : rôle du colitose (3-6 didésoxy-L-galactose), isomère optique de l'abéquose [25].

La grande similitude qui existe entre l'antigène 35 des *Salmonella* du groupe P et l'antigène O de certains *E. coli* (O 111 : B4) est bien connue de tous les immunologistes qui travaillent sur les *Enterobacteriaceae*. C'est ce qui nous a permis de travailler avec deux sérums anti-*E. coli* O 111 : B4 (un sérum de cheval et un sérum de lapin), aussi bien qu'avec un sérum de lapin anti-*S. adelaide*. Nous avons constaté nous-mêmes la très grande parenté immunologique de nos sérums, puisque :

1° La saturation des sérums anti-*E. coli* par *S. adelaide* supprime toutes ou presque toutes les agglutinines pour le germe homologue, et la saturation du sérum anti-*S. adelaide* par *E. coli* abaisse considérablement le titre en agglutinines pour la *Salmonella* (tableau VIII. sur lequel il faut lire  $< 100$  au lieu de 100).

2° La précipitation du sérum de cheval anti-*E. coli* par les polyosides extraits de *E. coli* et *S. adelaide* est identique. Celle du sérum de lapin anti-*E. coli* est même légèrement moindre avec le polyoside homologue (tableau VIII).

Le tableau IX montre bien le pouvoir inhibiteur spécifique du colitose sur la précipitation du sérum de cheval anti-*E. coli* par le polyoside de *S. adelaide*. Les autres 3-6 didésoxyhexoses et les deux autres sucres constitutifs du polyoside de *S. adelaide* (glucose et galactose) sont inactifs ou beaucoup moins actifs (tyvé-





TABLEAU IX. — Pouvoir inhibiteur de différents sucres sur la précipitation du sérum de cheval anti-*E. coli* O 111 : B4 par le polyoside de *S. adelaide*.

	Sucres inhibiteurs						
	Glucose	Galactose	Colitose (Co)	Colitose (Ad)	Tyvélose	Abéquose	Paratose
% inhibition du précipité obtenu avec le sérum de cheval anti <i>E. coli</i> et le polyoside de <i>S. adelaide</i>	0	5	20	28	13	0	3

Colitose (Co) = Colitose extrait de *E. coli* O 111 : B4. Colitose (Ad) = Colitose extrait de *S. adelaide*.

lose). Par contre, le colitose extrait de *E. coli* (colitose Co) est aussi actif que celui extrait de *S. adelaide* (colitose Ad). Ceci est vrai quel que soit le système précipitant considéré (tableau VIII), ce qui prouve bien l'identité de ces deux sucres, confirmée d'ailleurs par la chimie (tableau X).

TABLEAU X. — Identité de quelques constantes chimiques des colitoses extraits de *E. coli* et *S. adelaide*.

	Sucres	Alcools (x)	
	$[\alpha]_D$	Fp	$[\alpha]_D$
Colitose extrait de - <i>E. coli</i>	+4°	92-94°	-51° <sub>+2</sub>
- <i>S. adelaide</i>	+5,5°	91-93°	-51° <sub>+2</sub>

(x) = Alcool obtenu par réduction de l'abéquose au moyen du borohydrure de sodium [9].  $[\alpha]_D$  = Pouvoir rotatoire dans l'eau à 20°. Fp = Point de fusion.

e) Antigène 8 du polyoside de *S. newport* (groupe  $C_2$ ) : rôle de l'abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose).

Davies [5] et Mikulaszek [28], analysant les polyosides extraits de trois *Salmonella* du groupe  $C_2$ , qui possèdent les antigènes 6 et 8 (*S. newport*, *S. kottbus* et *S. virginia*), ont montré que ces trois polyosides contenaient tous un sucre migrant en chromatographie comme l'abéquose. Par contre, dans aucune des *Salmonella* du groupe  $C_1$  (antigènes 6 et 7) analysées jusqu'ici [21], on n'a retrouvé ce sucre. Puisque l'antigène 8 du groupe  $C_2$  est le

	Sérum de cheval			Sérum de lapin		
	anti <i>S. paratyphi B</i> (4, 5, 12) (x)	<i>S. newport</i> (6, 8)	anti <i>S. paratyphi B</i> (4, 5, 12)	anti <i>S. newport</i> (6, 8)	anti <i>S. paratyphi B</i> (hétérol.)	anti <i>S. newport</i> (homol.)
Agglutination par	<i>S. paratyphi B</i> (homol.)	<i>S. newport</i> (hétérol.)	<i>S. paratyphi B</i> (hétérol.)	<i>S. newport</i> (homol.)	<i>S. paratyphi B</i> (hétérol.)	<i>S. newport</i> (homol.)
Titres d'agglutinines (xx) avant absorption par les germes hétérol. après absorption par les germes hétérol.	6.400 3.200	3.200 100	3.200 <sub>+</sub> 100	12.800 <sub>+</sub> 6.400	100 100	6.400 <sub>+</sub> 3.200
Précipitation par	PstB (homol.)	PsNp (hétérol.)	PstB (hétérol.)	PsNp (homol.)	PstB (hétérol.)	PsNp (homol.)
Précipitines $\mu\text{g N/cm}^3$ des anticorps totaux précipités par le polyside	308 (100)	37 (12)	26 (6)	462 (100)	0	306
Inhibition de la précipi- tation par abérose extrait de						
	<i>S. para B</i> 51	65	69	3	5	0
	<i>S. newport</i> 44	65	63	3	-	0

PstB = Polyside extrait de *S. paratyphi B* (galactose, glucose, mannose, rhamnose, abérose). PsNp = Polyside extrait de *S. newport* (galactose, glucose, mannose, rhamnose, abérose). (x) = Antigènes O du tableau de Kauffmann-White présents sur la *Salmonella* ayant servi à préparer le sérum. (xx) = Récioproque de la dilution la plus forte à laquelle on observe à l'œil nu l'agglutination des germes. Sur la deuxième ligne lire < 100 au lieu de 100.

seul qui ne soit pas commun aux deux groupes, il faut bien penser que cet abéquose est présent dans l'antigène 8. Nous nous sommes demandé s'il s'agissait vraiment de l'abéquose ou d'un nouveau 3-6 didésoxyhexose migrant comme l'abéquose en chromatographie, comme c'est le cas pour le colitose. Nous avons travaillé avec un sérum de cheval et un sérum de lapin anti-*S. newport* et les sérums de cheval n° 2 et de lapin anti-*S. paratyphi* B du tableau IV.

On voit sur le tableau XI (sur lequel il faut lire à la deuxième ligne, « après absorption »  $< 100$  au lieu de 100) que, contrairement aux antigènes 35 de *S. adelaide* et O 111 de *E. coli* précédemment étudiés, les antigènes 4 et 8 ne donnent entre eux que de très faibles réactions croisées : les sérums de cheval donnent une très faible précipitation croisée, et si leur titre en agglutinines vis-à-vis de la *Salmonella* hétérologue est élevé, l'absorption du sérum par cette *Salmonella* ne fait pratiquement pas baisser le titre en agglutinines vis-à-vis de la souche homologue. Les sérums de lapin ne précipitent pas le polyside hétérologue et n'agglutinent que très faiblement la souche correspondante. Cette agglutination croisée est d'ailleurs absente des sérums des lapins moins fortement immunisés que les nôtres, généralement utilisés par les sérologistes, d'où la notion courante d'indépendance totale des deux groupes B (antigènes 1, 4, 5, 12) et C<sub>2</sub> (antigènes 6, 8).

Il nous a été impossible d'inhiber la précipitation des deux sérums anti-*S. newport* par le polyside de *S. newport* (intact ou oxydé par l'acide periodique) au moyen de l'abéquose, que celui-ci soit extrait de *S. paratyphi* B ou de *S. newport* (tableau XI) ; par contre, la précipitation croisée des sérums de cheval a été inhibée aussi bien par les deux sucres (tableau XI), montrant,

TABLEAU XII. — Identité de quelques constantes chimiques des abéquoses extraits d'une *Salmonella* du groupe B (*S. abortus equi*) et d'une *Salmonella* du groupe C<sub>2</sub> (*S. newport*).

	Sucre	Alcool	
	$[\alpha]_D$	Fp	$[\alpha]_D$
Abéquose extrait de			
- <i>S. abortus equi</i> (groupe B)	-3,6°	93-94°	+54° <sub>+3</sub>
- <i>S. newport</i> (groupe C <sub>2</sub> )	-5°	90°	+50° <sub>+3</sub>

Cf. les notes explicatives au bas du tableau IX.

d'une part, que le didésoxyhexose extrait de *S. newport* était bien de l'abéquose et, d'autre part, que *cet abéquose se trouvait en position terminale sur le polyoside extrait de S. newport* comme sur le polyoside extrait de *S. paratyphi* B, ainsi que le laissait déjà prévoir sa rapide libération au cours de l'hydrolyse acide du polyoside extrait de *S. newport* : il est responsable des réactions croisées qu'on peut observer entre ces deux polyosides et les *Salmonella* qui les portent.

Les résultats de l'étude chimique des abéquoses extraits de *S. newport* et de *S. paratyphi* B confirment leur identité (tableau XII).

#### B. — PRÉCIPITATIONS CROISÉES.

Les résultats des inhibitions spécifiques nous ont montré que, généralement, deux antigènes distincts portent à leur extrémité des sucres différents, mais que ce n'est pas toujours le cas, puisque l'abéquose est présent à l'extrémité des antigènes 4 et 8 et le glucose à l'extrémité des antigènes 1 et 12. On peut donc penser que dans ces deux cas le sucre terminal est lié, dans les antigènes distincts, à des sucres différents. En vue de déterminer la nature de ces sucres sur l'antigène 4, nous avons entrepris cette étude des précipitations croisées.

Les précipitations croisées du sérum anti-*S. typhi* par le dextrane et le mannane de la levure, découvertes par Heidelberger et Cordoba [42] et confirmées depuis [36], avaient permis de donner un schéma des sucres présents à la suite du tyvélose et du rhamnose sur les chaînes latérales responsables de la spécificité des antigènes 9 et 12 [36]. Nous avons étudié de la même façon le sérum anti-*S. paratyphi* B n° 1 de cheval qui est précipité par le dextrane et les galactomannanes (de gum gatto, de luzerne ou de trèfle) [42]. Ces précipitations sont bien spécifiques, puisqu'elles sont supprimées lorsqu'on élimine du sérum tous les anticorps précipitables par le polyoside extrait de *S. paratyphi* B (PsPtB du tableau XIII). Puisque l'élimination des anticorps 4, soit par le polyoside extrait de *S. typhi murium* (PsTm du tableau XIII), soit par le polyoside oxydé de *S. paratyphi* B (PsPtB<sub>ox</sub> du tableau XIII) supprime plus ou moins complètement les anticorps précipitables par les galactomannanes de gum gatto et de luzerne, il faut en conclure que ceux-ci font partie des anticorps anti-4. Leur absence parmi les anticorps anti-12 est prouvée par le fait que l'élimination de ces anticorps 12 par le polyoside extrait de *S. typhi* (PsTy du tableau XIII) ne fait pratiquement pas baisser la quantité d'anticorps précipitables par le galactomannane de luzerne.

Les anticorps précipitables par le dextrane font, au contraire, au moins partiellement, partie des anticorps 12, puisque l'élimination de ceux-ci par le polyoside extrait de *S. typhi* (PsTy du tableau XIII) diminue la quantité d'anticorps précipitables par le dextrane. Ce fait est encore plus net avec le sérum anti-*S. typhi* où tous les anticorps



TABLEAU XIII. — Réactions croisées entre les sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B et anti-*S. typhi* et quelques polyosides.

Polyoside précipitant	Sérum absorbé par				
	-	Ps PtB	Ps PtB <sub>ox</sub>	Ps Ty	Ps Tm
	I - Sérum anti <i>S. paratyphi</i> B				
	α) anticorps restants				
	<u>4, 5, 12</u> <sup>(a)</sup>	-	12	<u>4, 5</u>	5
Galactomannanes de	β) μg. d'azote du précipité				
Gum Gatto	270	19	40	-	-
Luzerne	255	28	-	243	2
Trèfle	200	25	-	-	-
Dextrane	67	-	-	33	
	II - Sérum anti <i>S. typhi</i>				
	α)-anticorps restants				
	<u>2, 12</u>	<u>2</u>			
	β) μg. d'azote du précipité				
Dextrane	108	7			

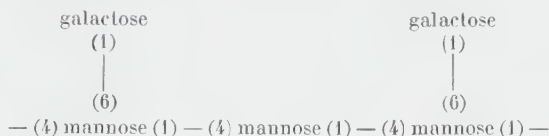
(a) Anticorps correspondant aux antigènes O du tableau de Kauffmann-White. Les chiffres soulignés désignent les antigènes spécifiques du groupe auquel appartient la *Salmonella* contre laquelle fut préparé le sérum. PsPtB = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B. PsPtB<sub>ox</sub> = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B oxydé par l'acide periodique. PsTy = Polyoside extrait de *S. typhi*. PsTm = Polyoside extrait de *S. typhi* murium.

précipitables par le dextrane sont éliminés après précipitation du sérum par le polyoside extrait de *S. paratyphi* B (PsPtB du tableau XIII) qui précipite les anticorps 12.

Nous retrouvons donc le résultat de notre précédente étude : présence dans l'antigène 12 de glucoses liés comme dans le dextrane. Toutefois, la découverte, dans l'antigène 12, d'une nouvelle chaîne latérale terminée par du glucose ne nous permet plus de conclure à la présence de ces glucoses sur la chaîne latérale terminée par du rhamnose ; il se peut que les anticorps précipi-

tables par le dextrane correspondent à cette chaîne terminée par du glucose, même si le glucose est incapable d'inhiber la précipitation de ces anticorps par le polyoside qui contient cette chaîne latérale.

D'autre part, l'antigène 4 doit contenir des groupements déterminants présents dans les galactomannanes. Ceux-ci sont constitués par une longue chaîne de mannoses liés en 1-4 sur lesquels sont greffés des galactoses accrochés au carbone 6 de certains mannoses suivant le schéma ci-dessous [*in* 43] :



Il faut penser que les anticorps anti-4 précipitables par les galactomannanes sont spécifiques soit d'un galactose terminal, soit du groupe galactose-mannose, soit de la chaîne de mannoses liés en 1-4. Cette dernière possibilité est éliminée par le fait que le polyoside paratyphique B oxydé par l'acide periodique est encore capable de précipiter ces anticorps. Les mannoses liés en 1-4 sont détruits par cette oxydation et ne pourraient donc plus réagir avec les anticorps correspondants. Le rôle du seul galactose terminal ne semble pas compatible avec les résultats de Heidelberger et Cordoba [42] qui n'ont pas obtenu de précipitations croisées avec d'autres polyosides contenant des galactoses terminaux. De plus, il est incompatible aussi avec le fait que le polyoside oxydé par l'acide periodique élimine les anticorps correspondants, puisque l'oxydation periodique devrait détruire tout galactose terminal. On est donc amené à admettre que le groupement déterminant commun à l'antigène 4 et aux galactomannanes est constitué par le groupe galactose-mannose et, pour les mêmes raisons que plus haut, que ce groupe doit être précédé d'un autre sucre non oxydable par l'acide periodique ; seul parmi les sucres constitutifs du polyoside B, l'abéquose répond à ce critère puisqu'étant le 3-6 didésoxy-D-galactose, lorsqu'il est lié en 1, il ne contient plus 2 OH adjacents (*Cf.* techniques, p. 306).

Nous proposons donc pour l'antigène 4 le schéma :



#### DISCUSSION.

Bien que l'on ait longtemps considéré les « antigènes » O, attribués aux *Salmonella* dans le tableau de Kauffmann-White, comme des molécules distinctes, les connaissances acquises actuellement

en immunochimie permettent de penser qu'il s'agit en réalité de chaînes latérales oligosidiques portées par une même molécule. Ceci a d'ailleurs été démontré pour les antigènes 6 et 8 de *S. newport* [33 a]; 1, 3, 19 de *S. senftenberg* [33 a]; 1, 4, 12 de *S. paratyphi* B [33 b] et 9 et 12 du polyoside extrait de *S. typhi* [33 c]. En tenant compte de ce fait, nous avons résumé les résultats expérimentaux acquis dans cette étude et dans la pré-

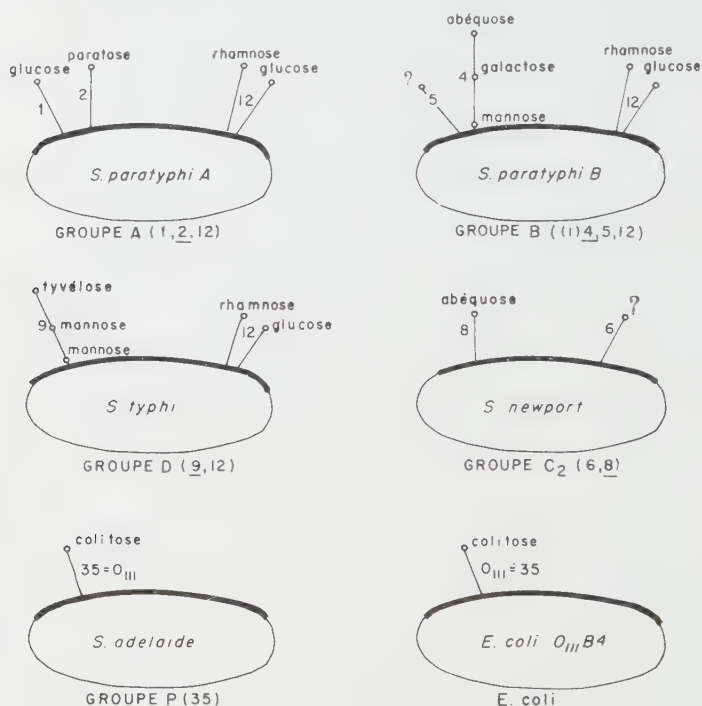


FIG. 1. — Schéma indiquant les sucres connus comme responsables de la spécificité de quelques antigènes O de Kauffmann-White.

Les chiffres représentent les antigènes O de Kauffmann-White. Les chaînes latérales des polyosides responsables de la spécificité de ces antigènes, ont été figurées par des « épines » qui sortent de la membrane des microbes, figurée par une ellipse encadrant le nom du germe. Sur ces épines ont été inscrits les sucres dont nous avons déterminé le rôle dans la spécificité de l'antigène O qui le porte, ainsi que sa place (terminale ou non) sur la chaîne polysidique à laquelle il appartient.

cédente [36], dans les schémas de la figure 1 où les antigènes O de chaque *Salmonella* sont représentés sous forme d'épine portant les sucres connus comme responsables de leur spécificité.

Ceci n'exclut aucunement l'existence éventuelle d'autres chaînes oligosidiques dans chacun de ces antigènes, ainsi que la présence d'éléments autres que les polyosides, comme l'un de nous l'a déjà signalé [33].

A chacune de ces chaînes oligosidiques correspondent dans certains immunsérums des anticorps susceptibles d'être inhibés par le seul sucre terminal [anticorps anti-tyvélose (anti-9) des sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B ; anticorps anti-rhamnose (anti-12) de ces mêmes sérums ; anticorps anti-glucose (anti-1) du sérum de cheval anti-*S. paratyphi* A ; anticorps anti-glucose (anti-12) du sérum de lapin anti-*S. typhi*]. Ces anticorps sont parfois si peu nombreux que nous n'avons pu les mettre en évidence que par l'artifice des réactions croisées (anticorps anti-abéquose (anti-8) du sérum anti-*S. newport*), souvent même, nous n'avons pas pu les déceler (anticorps anti-tyvélose (anti-9) du sérum anti-*S. typhi* de lapin ; anticorps anti-abéquose (anti-4) du sérum anti-*S. paratyphi* B de lapin ; anticorps anti-paratose (anti-2) des sérums anti-*S. paratyphi* A).

Nous allons discuter séparément les perspectives que ces résultats ouvrent dans les deux domaines de :

- a) la bactériologie : classification des *Salmonella* ;
- b) l'immunologie : importance des groupements apolaires dans la spécificité des sucres, réactions croisées et rôle de l'espèce dans la spécificité des anticorps.

#### A. — BACTÉRIOLOGIE.

##### *Classification des « Salmonella ».*

La classification des *Salmonella* dans le tableau de Kauffmann-White ne reposait, jusqu'à présent, que sur des bases purement sérologiques. L'étude de la constitution chimique d'une fraction de quelques-uns de ces antigènes apporte une nouvelle valeur à cette classification. Elle montre en particulier la signification réelle des groupes ainsi établis, puisqu'ils contiennent souvent un didésoxyhexose qui leur est propre. Une étude systématique des *Salmonella* [21] permettra peut-être de trouver les autres isomères des 3-6-didésoxyhexoses et d'autres sucres inconnus jusqu'ici. La présence du même abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose) dans deux antigènes de groupes distincts (4 du groupe B et 8 du groupe C<sub>2</sub>) fait envisager une parenté de ces groupes plus étroite qu'elle n'apparaissait d'après le tableau de Kauffmann-White : elle explique en tout cas les faibles réactions croisées signalées déjà par quelques auteurs [42].

La présence dans l'antigène 12 de deux chaînes oligosidiques, terminées l'une par le rhamnose et l'autre par le glucose, est en bon accord avec la complexité que les sérologistes ont reconnue à cet antigène (12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub>, 12<sub>3</sub>) sans que nous puissions actuellement

attribuer à l'un de ces sous-groupes l'une ou l'autre des deux chaînes oligosidiques. Soulignons d'ailleurs qu'il est fort possible que les antigènes 0 des *Salmonella* soient plus complexes que ne laisse prévoir le tableau de Kauffmann-White (comme on le sait déjà pour l'antigène 9 [39, 20]). Il se pourrait très bien que correspondent à un seul antigène plusieurs chaînes terminées par un même sucre, sans que les expériences d'inhibition nous permettent de les découvrir.

Quoi qu'il en soit, la connaissance de la constitution des chaînes oligosidiques constituant, même partiellement, les antigènes spécifiques des *Salmonella*, fait espérer pouvoir réaliser un jour la synthèse des oligosides spécifiques et résoudre ainsi le problème posé depuis si longtemps aux immunologistes : la préparation de sérums spécifiques ne contenant que des anticorps anti-9, anti-4, anti-12, etc. Ce problème n'est résolu actuellement que par la saturation des sérums au moyen de *Salmonella* convenables, procédé long et fastidieux. La préparation d'antisérums spécifiques des sucres, ou des di- ou triholosides terminaux devrait apporter une solution plus élégante et plus rapide à ce problème.

Enfin, la possibilité de déterminer la constitution chimique de l'antigène 1, dont nous savons déjà qu'il contient un glucose terminal, est particulièrement intéressante. On sait en effet que cet antigène n'est présent (au moins chez les *Salmonella* des groupes A, B et D) que sur les souches lysogènes pour le phage  $\phi$  [15]. Un travail en commun avec le Dr Stocker est en cours en vue d'aboutir à la connaissance de sa constitution chimique.

## B. — IMMUNOLOGIE.

a) *Rôle des groupements apolaires dans la spécificité des sucres terminaux.* — Lorsque l'on compare les résultats des expériences d'inhibition obtenus avec les 3-6 didésoxyhexoses, à ceux obtenus avec les hexoses, on est frappé, d'une part, par les petites quantités qu'il est nécessaire de mettre en jeu (nous utilisons 4 mg = 27  $\mu$ mol. de 3-6 didésoxyhexose contre 40 mg = 220  $\mu$ mol. d'hexose, voisins des 300  $\mu$ mol. utilisées par Kabat [18]) et, d'autre part, par la spécificité de ces 3-6 didésoxyhexoses : en dehors du tyvélose dans le tableau IX, on peut dire, en effet, que seul le sucre présent sur le polyside est actif, les autres isomères étant inactifs. C'est déjà ce que nous avons constaté avec le fucose et le rhamnose dans l'inhibition des anticorps 12 [36], et ceci s'oppose aux résultats obtenus par nous et par les autres auteurs avec les hexoses : le sucre présent sur le polyside est le plus actif, mais les autres isomères possèdent



aussi une activité non négligeable. Ceci serait en bon accord avec la conception de Pauling rappelée dernièrement par Marrack et Orlans [26] : « La spécificité de la combinaison doit dépendre de la distance entre un certain nombre d'atomes de l'antigène ou du haptène et la surface du site antigénique de l'anticorps. » Les groupes  $\text{CH}_2$ , hydrophobes, des désoxysucres doivent être beaucoup plus près de la surface correspondante de l'anticorps que les  $\text{CHOH}$ , hydrophiles, seuls présents sur les autres sucres : ils peuvent contribuer ainsi à la plus grande spécificité des groupements déterminants auxquels ils appartiennent.

b) *Réactions croisées.* — La multiplicité des anticorps correspondant à un même antigène ne fait plus de doute depuis les travaux de Landsteiner, Heidelberger et Haurowitz [22]. Les études physico-chimiques réalisées depuis sur les antigènes artificiels par Talmage et ses collaborateurs [37], Karush et Eisen [49], Pressman et ses collaborateurs [30] ont confirmé et complété les conclusions des premiers auteurs.

Cette multiplicité est due, en partie, à la présence de plusieurs groupements déterminants distincts sur l'antigène correspondant et, en partie, à la présence de plusieurs anticorps correspondant à un groupement unique. Elle explique le mécanisme des réactions croisées : tout antigène qui possède un groupement déterminant *totale*ment ou *partiellement* semblable à l'un de ceux de l'antigène homologue sera susceptible de s'unir avec la totalité, ou une partie, des anticorps auxquels le même groupement de l'antigène homologue a donné naissance.

Les réactions croisées entre des polysides naturels d'origine animale, végétale ou microbienne ont pu être ainsi expliquées par la reconnaissance de groupements déterminants communs totalement ou partiellement identiques [Cf. 13, 14, 11, 27].

Dans la présente étude nous apportons de nouveaux exemples de réactions croisées.

Nous avons constaté l'existence de chaînes oligosidiques identiques dans les polysides extraits de *S. adelaide* et *E. coli* O 111 : B4 (qui sont immunologiquement si proches que seul le sérum de lapin anti-*S. adelaide* peut les différencier) et dans les polysides extraits de *S. typhi*, *S. paratyphi* A et *S. paratyphi* B, qui contiennent en commun une partie de l'antigène 12 ( $12_1$ ,  $12_2$ ,  $12_3$  dans *S. typhi* ;  $12_1$ ,  $12_2$  dans *S. paratyphi* B ;  $12_1$ ,  $12_3$  dans *S. paratyphi* A).

Pour expliquer les réactions croisées observées entre les galactomannanes et le polyside de *S. paratyphi* B, l'hypothèse la plus compatible avec les résultats de l'oxydation périodique (Cf. p. 321) est de supposer que la chaîne oligosidique mannose-galactose, présente sur le galactomannane, constitue une partie de la chaîne

oligosidique qui porte la spécificité de l'antigène 4 sur le polyside extrait de la *Salmonella* : abéquose-galactose-mannose. La figure 2 exprime schématiquement le mode d'attachement des anticorps anti-4 avec les galactomannanes, ainsi que celui des anticorps anti-9 avec le mannane de la levure [36]. Nous ne con-

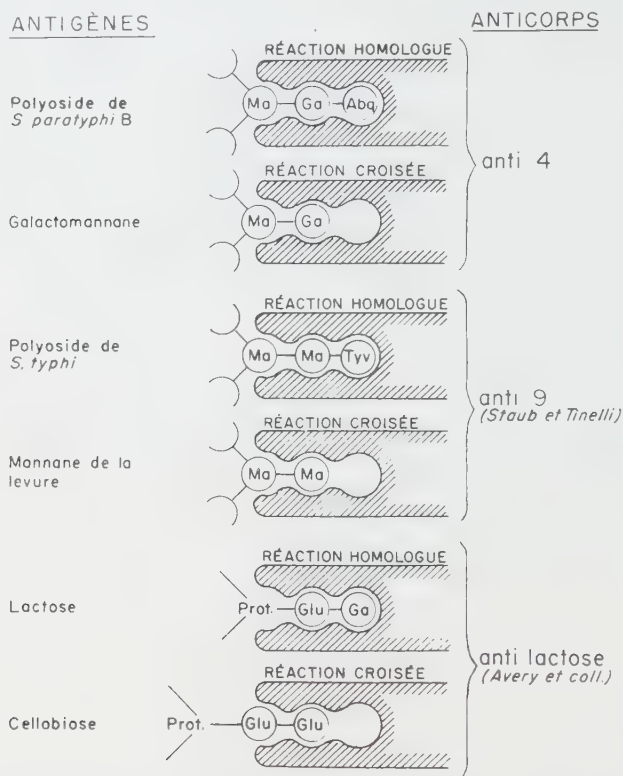


FIG. 2. — Réactions croisées entre des chaînes oligosidiques ne possédant que quelques sucres en commun.

naïssons pas d'autres exemples de telles réactions croisées entre polysides naturels. Néanmoins, on pourrait peut-être expliquer de la même façon la précipitation des anticorps anti-lactose ( $\beta$ -D-galactopyrannose 1-4 D-glucopyrannose) par le cellobiose ( $\beta$ -D-glucopyrannose 1-4 D-glucopyrannose) [fig. 2] observée par Avery, Gœbel et Babers [4]. De plus, les récents travaux de Kabat [47] sur les anticorps anti-dextrane et de Karush [49] sur les anticorps anti-lactose ont montré que les anticorps anti-oligosides possédaient une affinité encore marquée pour le deuxième

sucres de la chaîne oligosidique auquel ils correspondent. Ces résultats montrent qu'il faut être prudent dans l'interprétation des réactions croisées au moyen d'un polyoside de constitution connue. Un sucre terminal de ce polyoside peut très bien s'unir à des anticorps correspondant à un oligoside sur lequel ce sucre n'est pas terminal.

Enfin nous avons établi que la très faible réaction croisée observée entre le polyoside de *S. paratyphi* B et celui de *S. newport* était due à la présence d'un abéquose terminal sur ces deux polyosides. Le fait qu'on ne puisse précipiter que 12 p. 100 des anticorps du sérum anti-*S. paratyphi* B par le polyoside *newport* (tableau XI), alors que 50 p. 100 de ces mêmes anticorps sont susceptibles d'être inhibés par l'abéquose, signe l'hétérogénéité de ces derniers anticorps. Cette hétérogénéité peut être due à la présence de plusieurs chaînes latérales différentes, toutes terminées par de l'abéquose, sur le polyoside de *S. paratyphi* B, dont l'une seulement de composition inconnue serait présente sur *S. newport* ; elle peut être due aussi à la présence de plusieurs sortes d'anticorps correspondant à la chaîne abéquose-galactose-mannose indiquée sur la figure 1. Les anticorps anti-abéquose étant seuls capables de s'unir à une chaîne abéquose-X-Y présente sur le polyoside de *S. newport*, soit parce que le sucre X n'est pas du galactose, soit parce que l'abéquose n'est pas lié à ce sucre de la même façon que dans *S. typhi* (liaison  $\alpha$  ou  $\beta$ ), soit parce que l'abéquose terminal lui-même se trouve sous une forme différente dans les deux *Salmonella* (pyranoside ou furanoside). Le fait qu'un même sucre terminal ne détermine que de très faibles réactions croisées entre deux polyosides (inobservables même avec les sérums de lapins faiblement immunisés) n'est pas nouveau. On sait, en particulier, qu'il existe un fucose terminal sur les polyosides spécifiques des groupes sanguins A et H [2, 29] et, jusqu'à présent, on n'a pas observé de réactions croisées entre ces deux polyosides.

c) *Rôle de l'espèce et de l'individu sur le comportement des anticorps.* — C'est un lieu commun de constater les différences entre la spécificité des anticorps fabriqués par deux animaux d'espèces différentes ou de même espèce. Dans le cas des sérums anti-*S. typhi*, ce fait a déjà été souligné [34]. Ici la connaissance de la composition chimique partielle de quelques antigènes O du tableau de Kauffmann-White apporte de nouvelles données sur ces différences.

La réaction croisée entre *S. newport* et *S. paratyphi* B n'a pu être étudiée qu'avec les sérums de cheval qui seuls étaient précipités par le polyoside hétérologue. La très faible agglutination croisée de nos sérums de lapin était due à une longue immuni-

sation ; chez des animaux immunisés plus faiblement, on n'observe pas en général de réaction croisée, ce qui explique l'individualité des antigènes 4 et 8 (tous deux possédant un abéquose terminal) dans le tableau de Kauffmann-White. Si donc on accepte la seconde explication proposée pour la réaction croisée partielle entre ces antigènes (abéquose, seul sucre commun entre les deux chaînes oligosidiques), il faut penser que le cheval fabrique plus facilement que le lapin les anticorps spécifiques du sucre terminal. Ceci serait aussi en bon accord avec le fait qu'il est en général plus facile d'inhiber par le seul sucre terminal la précipitation des anticorps de cheval que celle des anticorps de lapin (tableaux II et IV). Ceci expliquerait enfin l'impossibilité d'obtenir des sérums spécifiques anti-*E. coli* chez le cheval, même après une courte immunisation, alors que c'est chose facile chez le lapin [23]. On a constaté en effet que deux espèces distinctes de *E. coli* (O 111 : B4 et O 55 : B5) possédaient le même colitose terminal [24].

Les variations à l'intérieur d'une même espèce, illustrées encore récemment par Kabat [17] à propos des anticorps anti-dextrane, se retrouvent dans cette étude, puisque les résultats de l'inhibition par les différents sucres simples sont absolument différents entre les deux sérums de cheval anti-*S. typhi* (tableau II) ainsi qu'entre les deux sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B (tableau IV).

#### RÉSUMÉ.

L'étude de l'inhibition au moyen de sucres simples des précipitations homologues et croisées des sérums anti-*Salmonella* par les polysides spécifiques extraits de ces germes a permis d'établir la nature des sucres terminaux partiellement responsables de la spécificité des antigènes 1, 2, 4, 8, 9, 12 et 35 du schéma de Kauffmann-White.

Parmi ces sucres, les 3-6 didésoxyhexoses, récemment découverts, jouent un rôle prépondérant. Le rôle du tyvélose (3-6 didésoxy-D-mannose) dans la spécificité de l'antigène 9 du groupe D a été confirmé ; l'abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose) joue le même rôle à l'extrémité de l'antigène 4 du groupe B, le colitose (3-6 didésoxy-L-galactose) à l'extrémité de l'antigène 35 du groupe P.

La complexité immunologique de l'antigène 12 (12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub>, 12<sub>3</sub>) se traduit par la présence de deux chaînes latérales terminées l'une par le rhamnose et l'autre par le glucose.

On a discuté le rôle du paratose (3-6 didésoxy-D-glucose) terminal dans la spécificité de l'antigène 2 des *Salmonella* du groupe A, ainsi que celui de l'abéquose terminal de l'antigène 8 du groupe C<sub>2</sub> et l'on a établi le rôle de cet abéquose terminal

dans les très légères réactions croisées observées parfois entre l'antigène 4 du groupe B et l'antigène 8 du groupe C<sub>2</sub>.

L'étude de la précipitation croisée des sérums anti-*S. paratyphi* B par les galactomannanes a permis d'attribuer à l'antigène 4 la chaîne oligosidique suivante : abéquose-galactose-mannose.

La portée de ces résultats a été discutée du point de vue bactériologique (tableau de Kauffmann-White) et immunologique : rôle des groupements polaires ou non dans la spécificité des sucres terminaux, réactions croisées, rôle de l'espèce et de l'individu sur la spécificité des anticorps.

*En conclusion*, ces résultats permettent d'apporter des bases chimiques à la classification de Kauffmann-White, établie sur des données purement sérologiques, et d'expliquer le mécanisme de certaines réactions croisées observées entre les *Salmonella*. Ils laissent entrevoir la possibilité d'une nouvelle méthode de préparation des sérums spécifiques, moins fastidieuse que les absorptions utilisées actuellement.

Nous tenons à remercier le D<sup>r</sup> Bonnefoi (Chef du Service des Vaccins, Institut Pasteur, Paris) pour l'intérêt qu'il a pris à ce travail, le D<sup>r</sup> Davies (Microbiological Station, Porton, Angleterre) à qui nous devons les polysides de *S. niloese* et *S. newport*, le professeur Hough (University of Bristol, Angleterre) qui nous a donné les galactomannanes de la luzerne et du trèfle, le professeur Kauffmann (Centre International des Salmonella, Copenhague) pour la souche de *E. coli* et pour l'intérêt qu'il a pris à ce travail, M. R. Lamy (Institut Pasteur, Paris) qui a dirigé l'immunisation des chevaux, le professeur Lederer (Institut de Biologie physico-chimique, Paris) à qui nous devons l'ascarylose et le tyvélose synthétique, le D<sup>r</sup> Le Minor (Institut Pasteur, Paris) qui nous a fourni la plupart des souches, le sérum de cheval anti-*E. coli* et les renseignements bactériologiques qui nous furent précieux, enfin le D<sup>r</sup> Stocker (Lister Institute, Londres) qui nous a fourni les germes secs de *S. paratyphi* A var. *durazzo*.

## SUMMARY

### IMMUNOLOGICAL STUDIES ON *Salmonella*.

#### V. ROLE OF CERTAIN SUGARS, PARTICULARLY 3-6 DIDESOXYHEXOSES, IN THE SPECIFICITY OF KAUFFMANN-WHITE O ANTIGENS.

Studies of inhibition by simple sugars of homologous and cross precipitations of anti-*Salmonella* sera by specific polysaccharides allow us to establish the nature of the terminal sugars, partially



responsible for the specificity of 1, 2, 4, 8, 9, 12 and 35 Kauffmann-White O antigens.

Amongst these sugars the newly discovered 3-6 didesoxyhexoses play a preponderant role. The role of tyvelose (3-6 didesoxy-D-mannose) in the specificity of group D antigen 9 has been confirmed; abequose (3-6 didesoxy-D-galactose) plays the same role at the end of group B antigen 4, as well as colitose (3-6 didesoxy-L-galactose) at the end of group P antigen 35.

The immunological complexity of antigen 12 (12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub>, 12<sub>3</sub>) corresponds with the presence of two side chains, one terminating in rhamnose, the other in glucose.

The role plaid by the terminal paratose (3-6 didesoxy-D-glucose) in the specificity of group A antigen 2 is discussed as well as the role of the terminal abequose in group C<sub>2</sub> antigen 8. The role of this abequose in the very weak cross precipitations sometimes observed between group B antigen 4 and group C<sub>2</sub> antigen 8 is established.

The study of the cross precipitations of anti-*S. paratyphi* B sera by galactomannans allows us to deduce the presence of the oligosaccharidic chain « abequose-galactose-mannose » in antigen 4.

The importance of these results is discussed both from the bacteriological (Kauffmann-White table) and the immunological point of view (role of polar and apolar groups in the specificity of terminal sugars, cross reactions, role of species and individual on antibodies specificity).

*In conclusion*: These results afford some chemical basis to the Kauffmann-White table, established only on serological data; they explain the mechanisms of some cross reactions between *Salmonella*; they suggest that it would be possible to prepare specific sera by a method less cumbersome than the present absorption methods.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] AVERY (O. T.), GOEBEL (W. F.) et BABERS (F. H.). *J. exp. Med.*, 1932, **55**, 769. — GOEBEL (W. F.) AVERY (O. T.) et BABERS (F. H.). *J. exp. Med.*, 1934, **60**, 599.
- [2] BRAY (H. G.), HENRY (H.) et STACEY (M.). *Biochem. J.*, 1946, **40**, 124.
- [3] COMBES (R.), STAUB (A. M.) et LE MINOR (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 75.
- [4] COURTOIS (J.). *Exp. Ann. Bioch. Med.*, 1948, **9**, 225. — FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). *8<sup>e</sup> Conseil de Chimie Solvay*. A. Stoops, édit., Bruxelles, 1950, 270.
- [5] DAVIES (D. A. L.). *Biochem. J.*, 1955, **59**, 700.
- [6] DAVIES (D. A. L.), STAUB (A. M.), FROMME (I.), LÜDERITZ (O.) et WESTPHAL (O.). *Nature*, 1958, **181**, 222.

- [7] FOUQUEY (C.), LEDERER (E.), LÜDERITZ (O.), POLONSKY (J.), STAUB (A. M.), STIRM (S.), TINELLI (R.) et WESTPHAL (O.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **246**, 2417.
- [8] FOUQUEY (C.), POLONSKY (J.), LEDERER (E.), WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). *Nature*, 1958, **182**, 944.
- [9] FOUQUEY (C.), POLONSKY (J.) et LEDERER (E.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, **40**, 315.
- [10] FREEMAN (G. G.). *Biochem. J.*, 1942, **36**, 340.
- [11] GOODMAN (J. W.) et KABAT (E. A.). *Feder. Proc.*, 1957, **16**, 415.
- [12] HEIDELBERGER (M.) et CORDOBA (F.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 375.
- [13] HEIDELBERGER (M.). *Ann. Rev. Biochem.*, 1956, **25**, 641.
- [14] HEIDELBERGER (M.) et coll. *J. Immunol.*, 1957, **78**, 419, 427 et 431 ; *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 113, 116 et 1135.
- [15] ISEKI (S.) et KASHIWAGI (K.). *Proc. Jap. Acad.*, 1955, **31**, 558.
- [16] JONES (J. K. N.) et PERRY (M. B.). *J. Am. chem. Soc.*, 1957, **79**, 2787.
- [17] KABAT (E. A.). *Revue Hématol.*, 1957, **12**, 606 ; *J. cell. comp. Physiol.*, 1957, **50**, Suppl. 1, 79.
- [18] KABAT (E. A.). *J. Am. chem. Soc.*, 1954, **76**, 3709.
- [19] KARUSH (F.). *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, Sect. II, 1958, **20**, 581.
- [20] W. KNAPP. *Z. Bakt. Or. I*, 1955, **164**, 57.
- [21] KAUFFMANN (F.), LÜDERITZ (O.), STIERLIN (H.), WESTPHAL (O.) [en préparation].
- [22] LANDSTEINER (K.). *The specificity of serological reactions*, Havard Univ. Press., 1946.
- [23] LE MINOR (L.) [communication personnelle].
- [24] LÜDERITZ (O.) et STAUB (A. M.) [résultats inédits].
- [25] LÜDERITZ (O.), STAUB (A. M.), STIRM (S.) et WESTPHAL (O.). *Biochem. Z.*, 1958, **330**, 193.
- [26] MARRACK (I. R.) et ORLANS (E. S.). *Progress in Stereochem.*, 1958, **2**, 228.
- [27] MC CARTY (M.) et LANCEFIELD (R. C.). *J. exp. Med.*, 1955, **102**, 11.  
— MC CARTY (M.). *Ibid.*, 1956, **104**, 629.
- [28] MIKULASZEK (E.). *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1954, **11**, 101 et *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, suppl., 40.
- [29] MORGAN (W. T. J.) et WATKINS (W.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **84**, 94.
- [30] NISONOFF (A.) et PRESSMAN (D.). *J. Immunol.*, 1958, **80**, 417.
- [31] PON (G.) et STAUB (A. M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 1132.
- [32] PON (G.). *Thèse Fac. Pharm.*, Paris, 1953. — PON (G.) et STAUB (A. M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 1283.
- [33] a) MEYER (K.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 282 ; b) NAKAYA (R.) et FUKUMI (H.). *Jap. J. med. Sci.*, 1953, **6**, 17 ; c) STAUB (A. M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 618.
- [34] STAUB (A. M.) et DAVARPANAH (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 338.
- [35] STAUB (A. M.) et PON (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 441.
- [36] STAUB (A. M.) et TINELLI (R.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, suppl. I, 65.

- [36 a] STAUB (A. M.), TINELLI (R.), WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). *VII<sup>e</sup> Congrès Microb.*, Stockholm, 1958, p. 115. — WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), STIRM (S.), STAUB (A. M.) et TINELLI (R.). *Idib.*, p. 98. — TINELLI (R.) et STAUB (A. M.). *IV<sup>e</sup> Congrès Chim. biol.*, Vienne, 1958, p. 194.
- [37] TALMAGE (D. W.). *J. Cell. comp. Physiol.*, 1957, **50**, suppl. 1, 229.
- [38] TINELLI (R.) et STAUB (A. M.). *Bull. Soc. Chim. biol.* (en préparation).
- [39] UETAKE (H.) et NAKAMO (W.). *Jap. Med. J.*, 1949, **2**, 109.
- [40] WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.) et BISTER (F.). *Z. Naturforsch.*, 1952, **7 b**, 148. — WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), EICHENBERGER (E.) et KEIDERLING (W.). *Ibid.*, 1952, **7 b**, 536.
- [41] WESTPHAL (O.). *Angew. Chem.*, 1952, **64**, 314. — WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), FROMME (I.) et JOSEPH (N.). *Angew. Chem.*, 1953, **65**, 555. — WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). *Angew. Chem.*, 1954, **66**, 407.
- [42] WHITE (B.). *Report Med. Res. Counc.*, 1926, **103**, 99.
- [43] WHISTLER (R. L.) et SMART (C. L.). *Polysaccharide Chemistry*, Acad. Press N. Y., 1953.
-

# **DÉTOXICATION ET PURIFICATION DU SÉRUM ANTI-VIRUS DE CARRÉ ÉQUIN OBTENU PAR INJECTION D'ORGANES VIRULENTS DE FURET**

par F. YEU et P. REGULARD (\*)

(avec la collaboration technique de D. PAVAGEAU et J.-M. BOUTRY).

*(Institut Pasteur, Annexe de Garches)*

Le sérum anti-virus de Carré préparé à l'Institut Pasteur sur le cheval, au moyen d'organes virulents de furet, s'est avéré, après plusieurs mois d'injections d'entretien, toxique pour le chien. Cette toxicité se manifeste sous forme de larges œdèmes, de placards hémorragiques, d'escarres au point d'injection, et entraîne quelquefois la mort de l'animal.

Néant, dans une communication à la Société Vétérinaire Pratique [4], a exposé une technique permettant de neutraliser le pouvoir toxique de ce sérum hétérologue en y adjoignant, juste avant l'injection, dans la seringue même, une égale quantité de sérum anti-virus de Carré homologue. Dans 22 cas traités par ce mélange, Néant n'a observé aucun des accidents décrits ci-dessus. D'après cet auteur « il semble qu'il existe dans le sérum hétérologue anti-virus de Carré une substance toxique — sans rapport avec une substance anaphylactisante — qui se trouve inhibée par adjonction de sérum homologue ».

Au terme de cette communication, Nicol conclut : « Au fur et à mesure que l'hyperimmunisation de nos chevaux se prolongeait, des propriétés nouvelles et inattendues étaient apparues dans le sérum ; alors que le cobaye le supportait toujours à haute dose, il était devenu toxique pour le chien et pour le chien seul... Que s'était-il passé ? Le sérum était devenu « anti-chien », parce que la parenté zoologique entre le furet et le chien était plus proche que nous ne l'avions supposé. Les réactions sont dues à l'apparition dans le sérum d'un anticorps spécifique. D'autres sérums hétérologues d'origine équine, sérum antitétanique et antidiphtérique, par exemple, ne donnent chez le chien rien de semblable ».

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

La technique d'utilisation de ce sérum hétérologue toxique, communiquée par Néant, présente, certes, un grand intérêt ; mais il était indispensable que des recherches soient poursuivies afin d'obtenir, d'une part, un sérum hétérologue non toxique et, d'autre part, la détoxication du sérum toxique.

Comme l'annonce Nicol au cours de la discussion issue de cette communication, un nouveau sérum anti-virus de Carré hétérologue, aussi actif que le précédent, a été obtenu à l'aide d'un antigène avianisé ; ce sérum ne provoque plus de phénomène toxique chez le chien.

Notre rôle fut d'étudier la détoxication du sérum anti-virus de Carré hétérologue toxique.

Depuis longtemps, de nombreux auteurs avaient observé l'action protectrice des sérums homologues vis-à-vis de certains phénomènes toxiques ; c'est ainsi que Wells [2], dès 1906, constatait que le sérum de chien inhibe l'autolyse du foie de chien à un très haut degré, et que cette propriété est détruite par un chauffage à 80°, pendant trente minutes. Ces observations ont été confirmées par Longcope [3], en 1908 ; cet auteur constatait de même que l'albumine de l'œuf possède un faible pouvoir protecteur. Le sérum des femelles pleines serait plus efficace que le sérum d'individus normaux ; c'est ainsi que Willheim et Szandicz [4] ont constaté que les sérums des femelles gravides ont, seuls, une action empêchante spécifique sur la dégradation autolytique des cellules placentaires non chauffées.

Jaumain, en 1923 [5], a obtenu la détoxication d'un sérum de bœuf, en mélangeant ce dernier, à parties égales, au sérum d'un animal sensible, le cobaye ; ce mélange est maintenu à l'étuve durant deux heures, puis à la glacière durant une nuit ; la fraction liquide obtenue par centrifugation ne provoque plus d'accidents toxiques. L'injection au cobaye du précipité émulsionné dans l'eau physiologique n'apporte aucune réaction. Si l'on remplace le sérum de cobaye par de l'eau physiologique, l'animal meurt cinq à dix minutes après l'injection du mélange.

Jaumain signale d'autre part que le sérum de cobaye, chauffé à 56°, perd en grande partie son pouvoir protecteur.

Si les résultats obtenus par Jaumain et Néant sont identiques, il faut cependant souligner que la technique mise au point par ce dernier auteur est infiniment plus rapide et plus pratique.

De nombreux auteurs ont étudié l'atténuation ou la perte de la toxicité sous l'action de différents facteurs physico-chimiques ; on sait depuis fort longtemps que la toxicité d'un sérum s'atténue par vieillissement, par chauffage, par congélation suivie de décongélation (Osborne [6]), par action du vide (Lumière et Couturier [7]). Wells [2], Lumière et Grange [8] constatent une



atténuation de la toxicité lorsqu'on élève le pH. Doerr et Pick [9], Aronson [10] signalent la disparition des phénomènes toxiques par action de certaines substances adsorbantes. Selon d'autres auteurs, l'alcool, l'éther, certains organes broyés, ainsi que la dialyse ou la filtration sur bougie, apporteraient une atténuation ou une disparition de la toxicité.

Au cours de nos essais personnels sur d'autres sérums, nous avons constaté que, si certaines protéines anticorps demeuraient stables sous l'action de la chaleur, ou des variations de pH, ou de certaines substances adsorbantes, d'autres protéines anticorps, contenues dans le même sérum, étaient par contre labiles.

Nous avons étudié successivement sur le sérum anti-virus de Carré toxique : le fractionnement par le sulfate d'ammoniaque, l'action de la chaleur, puis l'action en milieu alcalin de divers charbons actifs (1).

Les échantillons obtenus ont été titrés par la technique de déviation du complément, vis-à-vis de deux antigènes différents : virus extrait de rates de furets infectés, et virus avianisé récolté sur membranes chorio-allantoidiennes d'œuf de poule.

Les essais de toxicité ont été effectués sur le chien par injection intradermique de 0,25 cm<sup>3</sup> de chaque échantillon ; nous avons pu comparer ainsi sur un même animal, les réactions provoquées par des sérums obtenus au cours de différents essais, aux phénomènes toxiques du témoin. Lorsque la réaction intradermique était nulle, nous contrôlions alors l'atoxicité de l'échantillon par injection sous-cutanée de 10 cm<sup>3</sup>. En dernier lieu, nous avons éprouvé sur le furet le pouvoir neutralisant du sérum détoxiqué, vis-à-vis du virus.

#### I. — FRACTIONNEMENT PAR LE SULFATE D'AMMONIAQUE.

Dès 1953 nous avons déterminé le pourcentage en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, qui précipite la totalité des anticorps anti-virus de Carré ; nous avons effectué les fractionnements par 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, à pH 6,4-6,6. Les précipités et les surnageants correspondants avaient été titrés, après dialyse, par la technique de congutination (2). Les résultats montraient qu'à 28 p. 100 de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>,

(1) Nous exprimons tous nos remerciements aux Etablissements CECA, qui ont mis gracieusement à notre disposition différents échantillons d'Acticarbone.

(2) Nous exprimons toute notre gratitude à notre collègue le Dr R. Corvazier qui, avec la collaboration du Dr E. Lasfargues, a adapté la technique de congutination au titrage du virus de Carré (« La congutination, méthode de détection du virus de Carré », *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 676) et a effectué tous ces titrages.

la totalité des anticorps anti-virus de Carré était entraînée dans le précipité et constituait ce que nous appelons la « fraction anticorps » (fig. 1 et 2).

## II. — ACTION DE LA CHALEUR.

Le chauffage à 62° du sérum brut dilué au 1/2 produit une opalescence ; l'injection intradermique de 0,25 cm<sup>3</sup> de ce sérum opalescent provoque de fortes réactions cutanées, mentionnées dans le tableau I.

La présence de 7 p. 100 de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, au cours du chauffage à 62°, durant trente minutes, permet d'obtenir un sérum limpide, mais dont le pouvoir irritant demeure (tableau II).

## III. — ACTION DES « CHARBONS ACTIFS ».

Nous avons étudié le pouvoir adsorbant de charbons actifs de différentes qualités : 2S, 3S, SA, 2SA ; tous les essais ont été effectués dans les mêmes conditions : après dilution du sérum brut au 1/2, puis addition de 10 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, on fait agir le kaolin et le charbon à proportions égales, à pH 8,7, durant trente minutes à 62°.

Les essais diffèrent par la qualité et par la quantité de charbon ; certains ont subi, après l'action du charbon, le fractionnement par 28 p. 100 en poids SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, à pH 6,6.

FIG. 1. — Electrophorèse, après dialyse, des fractions de sérum anti-virus de Carré, précipitées, et non précipitées par différents pourcentages de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> : 1. Sérum brut anti-virus de Carré ; 2. Fraction non précipitée par 14 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 3. Fraction précipitée par 14 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 4. Fraction non précipitée par 16 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 5. Fraction précipitée par 16 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 6. Fraction non précipitée par 18 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 7. Fraction précipitée par 18 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 8. Fraction non précipitée par 20 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 9. Fraction précipitée par 20 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 10. Fraction non précipitée par 22 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 11. Fraction précipitée par 22 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

FIG. 2. — Electrophorèse, après dialyse, des fractions de sérum anti-virus de Carré, précipitées, et non précipitées par différents pourcentages de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> : 12. Fraction non précipitée par 24 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 13. Fraction précipitée par 24 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 14. Fraction non précipitée par 26 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 15. Fraction précipitée par 26 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 16. Fraction non précipitée par 28 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 17. Fraction précipitée par 28 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 18. Fraction non précipitée par 30 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 19. Fraction précipitée par 30 p. 100 en poids de de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 20. Fraction non précipitée par 32 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 21. Fraction précipitée par 32 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; 22. Sérum brut anti-virus de Carré.

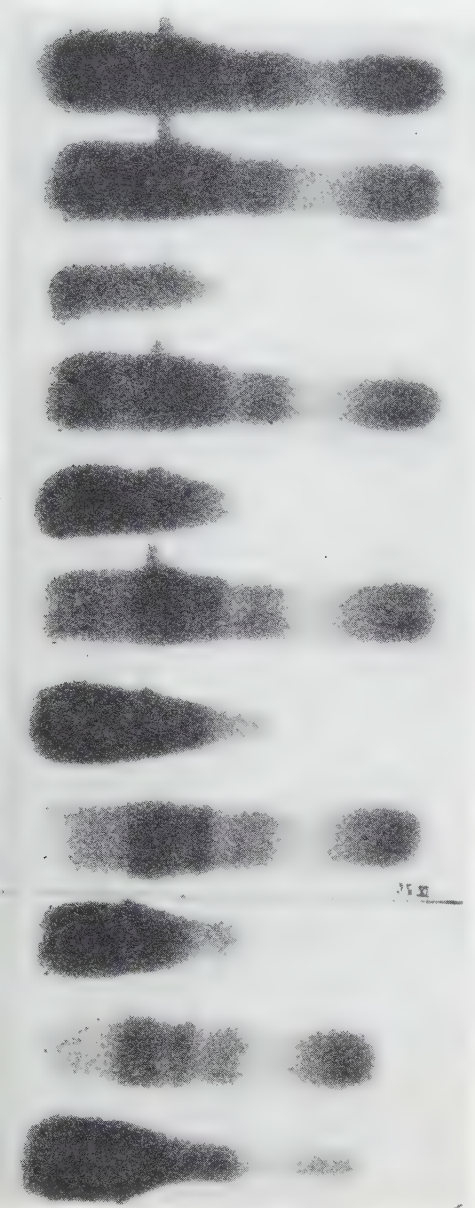


FIG. 1.

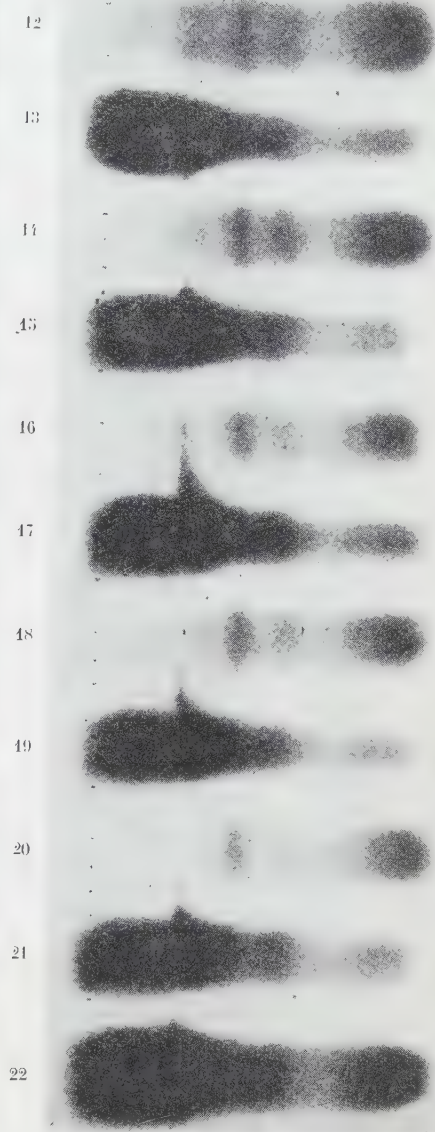


FIG. 2.

TABLEAU I. — Sérum chauffé à 62°.

Chiens d'expérience Observations après	CHASSE		ZIMMY		DIANE	
	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin
24H	+++ escarre	+++ escarre	++	+++ escarre	++	+++
48H	+++	+++	++	+++	-	+++ escarre
96H	+++	+++	+++	+++	-	+++
120H	++	+++ abcès	++	+++ escarre abcès	-	++

TABLEAU II. — Sérum chauffé à 62° en présence de 7 p. 100 de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Chiens d'expérience Observations après	CHASSE		ZIMMY		DIANE	
	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin
24H	+++ infecté	+++ escarre	+++ escarre	+++ escarre	++	+++
48H	+++ abcès	+++	+++	+++	+++	+++ escarre
96H	+++ abcès	+++	+++	+++	++	+++
120H	+++ abcès	+++ abcès	++	+++ escarre abcès	+	++

TABLEAU III. — Charbon 2S : 5 g par litre.  
Sans fractionnement et après fractionnement par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Chiens d'expé- rience Observation après	CHASSE			ZIMMY			DIANE		
	Sans frac- tion	Après frac- tion.	Témoin	Sans frac- tion.	Après frac- tion.	Témoin	Sans frac- tion.	Après frac- tion.	Témoin
24H	++	+	+++ escarre	+	-	+++ escarre	++	++	+++
48H	+++	+	+++	+	-	+++	+	+++	+++ escarre
96H	++	-	+++	-	-	+++	-	+	+++
120H	++	-	+++ abcès	-	-	+++ escarre abcès	-	indur- ation	++

Les réactions, après injections intradermiques des sérums ainsi obtenus, sont résumées dans les tableaux III et IV.

Le sérum obtenu après fractionnement s'avère moins toxique que le sérum n'ayant pas subi ce fractionnement, à l'exception

de Diane, qui n'a cependant donné qu'une simple induration après cent vingt heures.

D'après les résultats mentionnés dans les tableaux III et IV, nous pouvons conclure que :

a) L'action détoxiquante du charbon 2S est sensiblement identique à celle du charbon 3S.

b) Les sérums fractionnés par 28 p. 100 de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  se sont montrés moins toxiques sur les trois chiens d'expérience que les sérums non fractionnés.

TABLEAU IV. — Charbon 3S : 5 g par litre.  
Sans fractionnement et après fractionnement par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Chiens d'expé- rience	C H A S S E			Z I M M Y			D I A N E		
	Sans frac- tion après	Après frac- tion.	Témoin	Sans frac- tion	Après frac- tion.	Témoin	Sans frac- tion	Après frac- tion.	Témoin
24H	++	+	+++ escarre	+	-	+++ escarre	+	++	+++
48H	+++	+	+++	+	-	+++	+	+	+++ escarre
96H	+++	-	+++	-	-	+++	+	-	+++
120H	++	-	+++ abcès	-	-	+++ escarre abcès	-	-	++

TABLEAU V. — Charbons SA et 2SA : 5 g par litre et 10 g par litre.  
Avec fractionnement par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Chiens d'expé- rience	D I A N E					J E U N E				
	S A		2 S A		Témoin	S A		2 S A		Témoin
Observation après	5%	10%	5%	10%		5%	10%	5%	10%	
24H	-	-	+	-	+++ escarre	+	+	++	+	+++ escarre
48H	-	-	+	-	+++ escarre	+	+	+	+	+++ escarre
72H	-	-	-	-	+++ escarre	-	-	-	-	+++ escarre
81.	-	-	-	-	+++ escarre	-	-	-	-	+++ escarre

Les résultats groupés dans le tableau V montrent que, si dans l'utilisation des charbons neutres SA, 2SA les facteurs qualité et quantité ne jouent qu'un faible rôle, le pouvoir détoxiquant de ces charbons est cependant supérieur à celui des charbons 2S et 3S. Il faut remarquer que l'utilisation de certains charbons offre de grandes difficultés pratiques (filtration, légère opalescence...) ; nous avons choisi le charbon SA, qui, dans les proportions de



5 p. 1 000, nous a permis d'obtenir un sérum totalement détoxiqué, parfaitement limpide, de préparation simple.

Si l'action séparée de chacun des facteurs étudiés ne détoxique que partiellement le sérum, l'association de tous ces facteurs permet une détoxication totale.

Le fait que le fractionnement par 28 p. 100 de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  soit indispensable pour obtenir un sérum totalement détoxiqué permet de penser que les protéines toxiques seraient réparties à la fois sur la « fraction anticorps » et sur la « fraction non anticorps » : les protéines toxiques de la « fraction anticorps » étant thermolabiles et sensibles à l'alcalinité et aux adsorbants ; celles de la « fraction non anticorps » restant stables vis-à-vis de ces mêmes agents physico-chimiques et conservant leur caractère toxique. Cela explique la nécessité d'éliminer la « fraction non anticorps » et de poursuivre la détoxication sur la « fraction anticorps » seule.

Pour détoxiquer le sérum anti-virus de Carré équin, obtenu à partir d'organes virulents de furet, nous avons adopté la technique suivante :

La « fraction anticorps » est obtenue en précipitant le sérum brut dilué au 1/2 par 28 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , à pH 6,4-6,6 ; ce précipité est repris par de l'eau distillée de manière à obtenir une solution d'anticorps contenant 10 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

En présence de 5 p. 1 000 de kaolin et de 5 p. 1 000 de charbon SA, on chauffe le sérum durant trente minutes à 62°, le pH étant ajusté à 8,7. Après filtration les anticorps sont à nouveau précipités par addition de 18 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . Le précipité donne, après dialyse, un sérum que l'on traite par un gel de phosphate tricalcique [41]. Ce sérum détoxiqué et purifié est parfaitement limpide et filtre aisément à travers une membrane stérilisante ; injecté par voie sous-cutanée sous le volume de 10 cm<sup>3</sup>, il ne provoque plus de phénomène toxique chez le chien ; il neutralise, par centimètre cube, 20 000 doses minima mortelles de virus pour le furet. Le titre de ce sérum est environ le double de celui du sérum brut, leurs taux en protéines étant très voisins ; le taux de purification est donc sensiblement égal à 2 ; le rendement est de 50 p. 100 environ.

L'image électrophorétique du sérum anti-virus de Carré ainsi obtenu est sensiblement identique à celle d'un sérum purifié antidiphthérique ou antitétanique. Toutefois, dans le cas du sérum anti-virus de Carré, la tache des globulines anticorps est située au niveau de la globuline T de van der Scheer, tandis que les anticorps ayant subi l'action enzymatique de la pepsine migrent à la vitesse des  $\gamma$ -globulines ; cette propriété est particulièrement mise

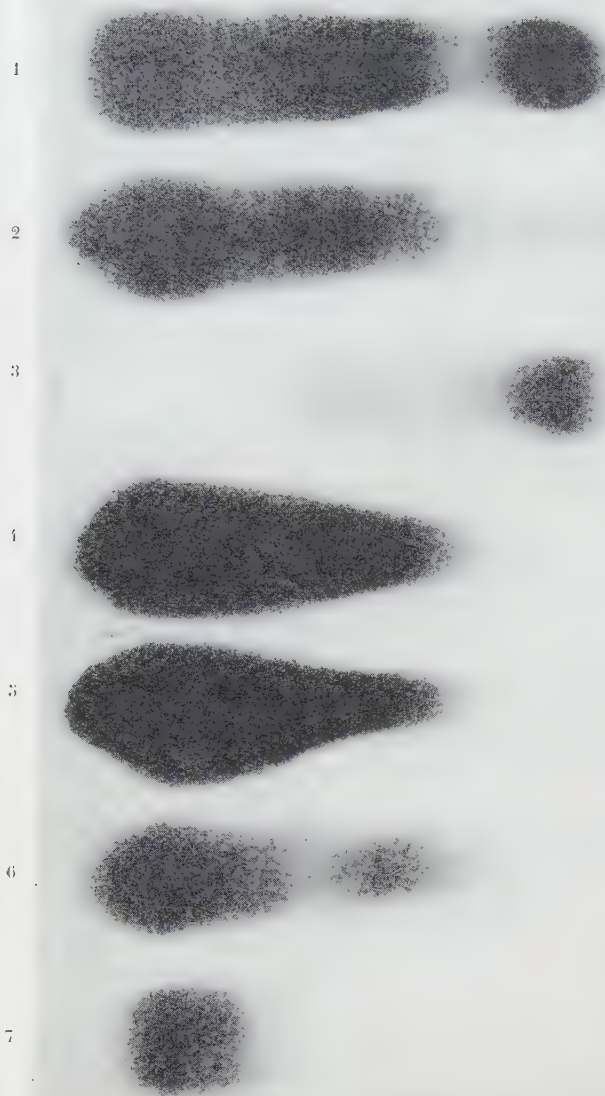


FIG. 3. — Electrophorèse : 1. Sérum brut anti-virus de Carré. 2. Fraction de sérum anti-virus de Carré, précipitée par 28 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (fraction anticorps), dialysée ; 3. Fraction de sérum non précipitée par 28 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (fraction non-anticorps) dialysée ; 4. Sérum anti-virus de Carré, purifié, non détoxiqué ; 5. Sérum anti-virus de Carré, purifié, détoxiqué ; 6. Sérum antidiphthérique purifié (ayant subi l'action enzymatique de la pepsine) ; 7. Sérum antidiphthérique purifié à partir du complexe antigène-anticorps (ayant subi l'action enzymatique de la pepsine).

en évidence dans le cas du sérum antidiphthérique purifié à partir du complexe antigène-anticorps [12, 13].

Notons que l'électrophorèse sur papier ne nous a pas permis de distinguer, au cours de nos essais, un sérum demeuré toxique après traitement, d'un sérum totalement détoxiqué (fig. 3).

#### RÉSUMÉ.

Le sérum anti-virus de Carré équin obtenu par injection d'organes virulents de furet s'est avéré toxique pour le chien plusieurs mois après le début de sa préparation. Nous avons réalisé la détoxication et la purification de ce sérum par action du charbon activé SA, à pH 8,7, à 62°, sur la fraction de sérum précipitée par 28 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Cette technique nous a permis d'obtenir un sérum purifié et détoxiqué, avec un rendement de 50 p. 100 environ et un taux de purification voisin de 2.

#### SUMMARY

DETOXICATION AND PURIFICATION OF HORSE ANTI-CARRÉ VIRUS SERUM, OBTAINED AFTER INJECTION OF FERRET VIRULENT ORGANS.

This serum has proved virulent for dogs several months after its preparation. The authors have carried out its detoxication and purification by means of activated SA carbon, at pH 8,7 and 62°, using the serum fraction precipitated by 28 % (dry weight) of  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

With this technique it is possible to obtain a purified and detoxified serum with a yield of about 50 % and a purification titre of about 2.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] NÉANT (M.). *Bull. Soc. vét. prat.*, 1957, **41**, 298.
- [2] WELLS (G.). *J. med. Res.*, 1906, **15**, 149.
- [3] LONGCOPE (W. T.). *J. med. Res.*, 1908, **18**, 45.
- [4] WILLHEIM (R.) et SZANDICZ (S.). *Biochem. Z.*, 1914, **65**, 219.
- [5] JAUMAIN (D.). *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 1213.
- [6] OSBORNE (W. A.). *Austral. J. exp. Biol.*, 1930, **7**, 225.
- [7] LUMIÈRE (A.) et COUTURIER (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **179**, 218.
- [8] LUMIÈRE (A.) et GRANGE (R. H.). *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 681.
- [9] DOERR (R.) et PICK. *Z. Immunitätsf.*, 1913, **19**, 251.
- [10] ARONSON (J.). *J. Immunol.*, 1928, **15**, 465.
- [11] AMOUREUX (G.) et YEU (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 165.
- [12] YEU (F.) et PAVAGEAU (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 240.
- [13] YEU (F.) et PAVAGEAU (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 480.

# CULTURE DU VIRUS DE LA VACCINE

## II. — CULTURE DU VIRUS DE LA VACCINE

### SUR CELLULES ÉPITHÉLIALES DE REIN DE VEAU EN COUCHE MONOCELLULAIRE

par P. SUREAU et E. R. BRYGOO (\*)

(avec la collaboration technique de RAZAFIMAHATRATRA).

(*Institut Pasteur de Madagascar* [Directeur : J. COURDURIER])

Nous poursuivons l'étude de la multiplication du virus vaccinal en culture de tissus dans le but d'obtenir un vaccin antivariolique dégagé des servitudes qui sont celles de tout vaccin vivant, produit par inoculation à l'animal.

Après avoir utilisé des cultures de cellules épithéliales de rein de lapin [1] nous employons maintenant le rein de veau. Le vaccin jennérien étant traditionnellement préparé sur jeune bovidé (génisse, ou bufflon, ou jeune zébu), il est plus logique d'utiliser des cultures de tissus de bovin que des cultures de tissus de lapin ; d'autre part, si l'on veut obtenir une quantité importante de cultures cellulaires en vue de la production de vaccin, le rein de veau présente, de par son volume, un avantage évident.

Le développement du virus vaccinal sur culture de cellules de rein de veau a été étudié par Warren et Cutchins [2], qui ont montré que le virus se multiplie rapidement et produit un effet cytopathogène au cours de passages répétés. Les mêmes auteurs ont proposé d'utiliser cet effet cytopathogène pour effectuer le titrage du vaccin antivariolique [3]. Enfin, Dostal [4] a utilisé des cultures de cellules trypsinées de rein de veau pour préparer un vaccin antivariolique exempt de germes.

#### I. — TECHNIQUES, MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1° PRÉPARATION DU TISSU. — Les reins sont prélevés à l'abattoir sur des veaux sains, aussitôt après l'abattage. Après dissection, la corticale est hachée aux ciseaux et les fragments lavés trois fois dans une solution de P. B. S. (P. B. S. incomplet, sans chlorure de calcium ni chlorure de magnésium [5]).

2° TRYPSINATION. — Les fragments de corticale sont transvasés dans une fiole Fourneau de 500 ml et recouverts de trois fois leur volume

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

d'une solution de trypsine (Mann 1/300) à 0,25 p. 100 dans le P. B. S., préalablement réchauffée à 37° (300 ml environ sont nécessaires). Une prédigestion de trente minutes est faite à la température de 37° avec agitation constante sur agitateur magnétique. La trypsine est alors décantée et remplacée par un même volume de trypsine fraîche. La digestion proprement dite s'effectue ensuite à froid, selon la méthode de Bodian [6], en suivant la technique de Daniel et Depoux [7]. A la température de +4°, et en maintenant une agitation modérée constante, la digestion est complète en vingt heures.

3° PRÉPARATION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE. — La suspension obtenue en fin de trypsination est recueillie en totalité dans un pot à centrifuger de 1 000 ml en la filtrant sur voile de nylon pour éliminer les déchets fibrineux. Après centrifugation de dix minutes à 1 000 t/mn, le liquide surnageant est aspiré et remplacé par du P. B. S. dans lequel les cellules sont remises en suspension par agitation. Deux lavages au P. B. S. sont effectués, suivis d'un lavage avec du milieu de culture, contenant des antibiotiques mais pas de sérum.

4° DILUTION, NUMÉRATION. — Le culot cellulaire finalement obtenu est mis en suspension dans le milieu de culture à raison de 6 à 8 ml par litre de milieu. La corticale d'un rein de veau fournit en moyenne 30 à 40 ml de culot cellulaire, permettant de préparer 5 l de suspension cellulaire. Les numérations faites à l'hématimètre, après coloration avec la solution acide citrique-cristal violet, donnent en moyenne 800 000 à 1 000 000 de cellules par millilitre de suspension.

5° MILIEU DE CULTURE. — Nous utilisons le milieu de Earle à l'hydrolysate de caséine, mis au point par Lépine et coll. [8, 9].

Le milieu est préparé sous forme concentrée dix fois, par fractions de 2 l (quantité suffisante pour 20 l de milieu dilué). Il est stérilisé par filtration sur bougie L3 et gardé à +4°, en flacons de 500 ml.

La solution de bicarbonate de soude-rouge de phénol est préparée à part sous forme non concentrée : solution à 4,4 p. 100 de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  et 0,04 p. 100 de rouge de phénol dans l'eau bidistillée. Stérilisation par filtration sur bougie L3.

Au moment de l'emploi, le milieu est dilué de la façon suivante :

Solution de Earle à l'hydrolysate de caséine, concentrée dix fois .....	100 ml
Solution de bicarbonate-rouge de phénol .....	50 ml
Eau bidistillée stérile .....	850 ml

On ajoute alors des antibiotiques :

Solution de pénicilline-streptomycine (contenant pour 1 ml 100 000 unités de pénicilline et 25 mg de streptomycine) .....	2 ml
Chloromycétine (solution à 50 mg/ml dans l'alcool absolu) .....	0,1 ml
Mycostatine (suspension à 50 mg/ml dans l'alcool absolu) .....	0,2 ml



Le pH est éventuellement ajusté à 7,2 par barbotage de gaz carbonique.

Ce milieu est additionné de sérum de veau (stérilisé par filtration sur disque Seitz et décomplémenté trente minutes à 56°) dans la proportion de 10 p. 100 pour le milieu de croissance et 2 p. 100 pour le milieu d'entretien.

6° PRÉPARATION DES CULTURES CELLULAIRES EN BOÎTES DE ROUX. — La suspension cellulaire est répartie dans des boîtes de Roux « Pyrex » de 1 000 ml à raison de 100 ml par boîte. Les boîtes, bouchées au caoutchouc, sont mises à incuber à l'étuve à 37°.

7° PRÉPARATION DES CULTURES EN TUBES. — Les cultures cellulaires en tubes Pyrex de 16 × 160 destinées aux titrages de virulence (et les cultures en tubes à lamelle destinées à faire des préparations colorées) sont préparées par trypsination de la couche cellulaire obtenue en boîtes de Roux. On utilise des cultures âgées de 8 à 15 jours, ayant subi un ou deux changements de milieu. La veille de la trypsination, le milieu est remplacé par du milieu de croissance frais (à 10 p. 100 de sérum). Après avoir enlevé ce milieu, on verse sur la couche cellulaire 25 ml d'une solution de trypsine à 0,25 p. 100 dans le P. B. S. Après quinze à vingt minutes environ de contact, avec agitation manuelle douce, les cellules sont décollées. Le liquide est aspiré et centrifugé cinq minutes à 1 000 t/mn. Le culot cellulaire ainsi obtenu est mis en suspension dans du milieu de culture sans sérum et recentrifugé. Après ce lavage, le culot cellulaire est dilué dans 200 ml de milieu de culture (milieu de croissance contenant 10 p. 100 de sérum) en émulsionnant bien les cellules par pipettage répété. La suspension cellulaire obtenue est répartie à raison de 2 ml par tube. Les tubes sont mis à incuber à 37°.

En trois jours environ, ces cultures-filles donnent une couche cellulaire complète, prête à utiliser.

8° CONSERVATION DES CULTURES A +4°. — Il est possible d'obtenir ces cultures cellulaires en tubes, destinées aux titrages, à des intervalles de temps variables et selon les besoins, en conservant à basse température les cultures cellulaires obtenues en boîtes de Roux. Cette conservation a été préconisée pour les cellules HeLa par Swim et Parker [40] et pour les cellules de rein de singe par Crawford [41]. Cette technique nous a donné avec les cellules de rein de veau de bons résultats. Des cultures en boîtes de Roux, âgées de 6 à 14 jours, ayant subi un ou deux changements de milieu sont utilisées pour cette conservation. Le milieu est renouvelé avant que les cultures soient placées au réfrigérateur à +4°/+6°. Après un délai qui a varié dans nos essais de huit à vingt-cinq jours les boîtes sont retirées du froid, le milieu est renouvelé, et les boîtes remises à incuber à 37°. En deux ou trois jours, les cellules forment à nouveau une couche cellulaire complète de cellules bien étalées, prêtes à être trypsinées en vue de la préparation de cultures en tubes.

9° TECHNIQUE D'INOCULATION DES CULTURES DE TISSUS. — a) Boîtes de Roux : le milieu de culture (100 ml) est enlevé, le liquide virulent

est inoculé à raison de 10 ml par boîte (si on inocule une série importante de boîtes, on utilise une seringue « Cornwall » de 10 ml). Les boîtes sont laissées à plat, immobiles pendant soixante minutes, à la température du laboratoire. Après ce contact, on ajoute à chaque boîte 90 ml de milieu d'entretien : milieu à l'hydrolysate de caséine contenant seulement 2 p. 100 de sérum. Les boîtes sont mises à l'étuve à 37°, stationnaires.

b) Tubes de 16 × 160 et tubes à lamelles : le milieu de culture est aspiré, le liquide virulent (pur ou dilué de 10 en 10 lors des titrages) est inoculé sous un volume de 0,2 ml. Après soixante minutes de contact, on ajoute dans chaque tube 1,8 ml de milieu d'entretien. Les tubes à lamelles sont remis à l'étuve, stationnaires ; les tubes de 16 × 160 sont placés dans un tambour tournant.

10° ORIGINE DU VIRUS UTILISÉ. — Nous avons utilisé comme source de virus vaccinal le vaccin antivariolique desséché de l'Institut de la Vaccine (Rue Ballu). Pour obtenir un produit bactériologiquement stérile, en vue de l'inoculation des cultures de tissus, cette lymphé desséchée a été diluée dans du liquide de Hanks additionné d'antibiotiques : 2 comprimés de 100 doses dans 100 ml de Hanks contenant : pénicilline, 100 000 U. ; streptomycine, 25 mg ; chloromycétine, 5 mg, et mycostatine, 10 mg. Cette suspension a été centrifugée huit minutes à 4 000 t/mn à la température de zéro degré ; le surnageant a été recentrifugé douze minutes à 6 000 t/mn, également à zéro degré. Le liquide virulent limpide ainsi obtenu, bactériologiquement stérile, a servi de souche de virus vaccinal pour l'inoculation des cultures cellulaires.

## II. — RÉSULTATS.

1° DÉVELOPPEMENT DES CULTURES CELLULAIRES. — Après trois jours d'incubation à 37°, les cellules sont collées au verre et surmontées d'un liquide limpide. La couche cellulaire est presque complète le septième jour. Le milieu est alors remplacé par du milieu de croissance neuf et les cultures remises à incuber jusqu'au neuvième jour. La couche cellulaire est alors complète et bien développée ; les cellules sont prêtes pour l'inoculation.

2° EFFET CYTOPATHOGENE PROVOQUÉ PAR LE VIRUS VACCINAL SUR CULTURES DE CELLULES DE REIN DE VEAU. — Les cultures cellulaires inoculées de virus vaccinal sont examinées microscopiquement

FIG. 1. — Cellules épithéliales de rein de veau normales (cultures cellulaires examinées à l'état frais).

FIG. 2. — Effet cytopathogène provoqué par le virus vaccinal ; lésions +++ : plages claires bordées de cellules altérées (cultures cellulaires examinées à l'état frais).

FIG. 3. — *Idem* ; lésions +++ : couche cellulaire dissociée, amas de cellules agglutinées en voie de lyse (cultures cellulaires examinées à l'état frais).

FIG. 1

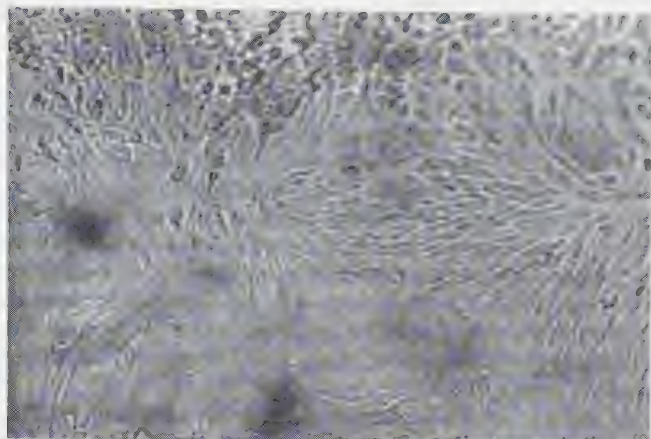


FIG. 2

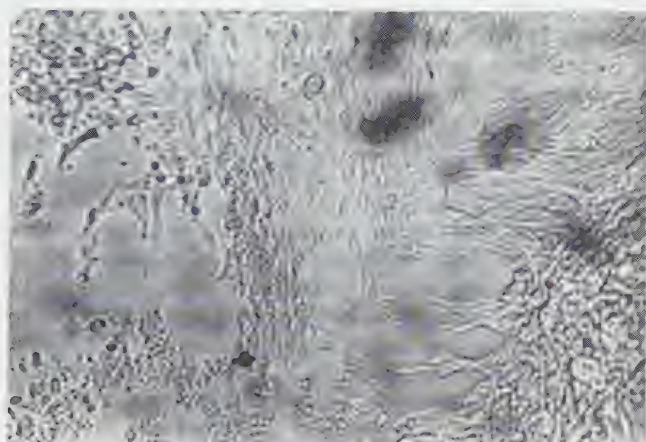
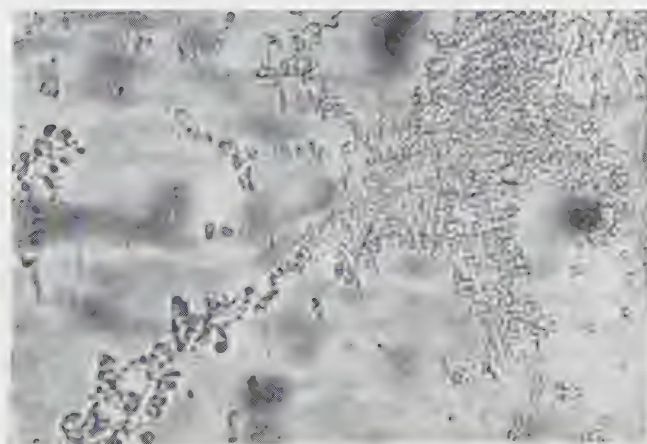


FIG. 3



chaque jour. On observe un effet cytopathogène tout à fait comparable à celui qui se produit sur cellules de rein de lapin [1] : on voit d'abord apparaître, au sein de la couche cellulaire, des îlots de cellules granuleuses, arrondies et réfringentes (notation +) ; ces îlots deviennent plus nombreux et font bientôt place à des plages claires, bordées de cellules altérées (notation ++ ) ; ces plages de nécrose s'étendent et tendent à confluer, dissociant la nappe cellulaire (notation +++ ) ; enfin, la couche cellulaire est complètement dissociée et il ne reste plus que des amas de cellules agglutinées en voie de lyse, amas qui se détachent de la paroi de verre [notation ++++] (fig. 1, 2, 3).

Au cours de l'adaptation du virus vaccinal aux cultures de cellules de rein de veau, on a observé que cet effet cytopathogène tend à devenir de plus en plus précoce et intense : après quelques passages, le virus vaccinal donne des lésions notées ++ dès la vingt-quatrième heure, atteignant +++ dès le deuxième jour. Le liquide virulent est récolté le troisième jour quand les lésions atteignent ++++ et que les cellules sont presque complètement décollées.

3° COLORATION DE CULTURES EN TUBES A LAMELLES POUR MISE EN ÉVIDENCE DES INCLUSIONS CELLULAIRES. — Des cultures ont été inoculées avec des suspensions virulentes pures et diluées, puis colorées après des délais variables (douze, dix-huit, vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze heures) en même temps que des cultures-témoins. Les colorations utilisées ont été l'hémalum-éosine et le May-Grünwald-Giemsa. Cette dernière coloration nous a donné les préparations les plus caractéristiques [12]. Elle met en évidence, dans les cellules infectées de virus vaccinal, des inclusions cytoplasmiques éosinophiles de structure plus ou moins homogène et de taille variable, en général uniques, qui semblent correspondre aux corps de Guarneri. Par contre, il nous a semblé impossible de considérer comme des corps élémentaires des granulations colorées en rouge au Giemsa, disséminées dans le cytoplasme, très nettement visibles, mais que l'on voit aussi, bien que rarement, dans les cellules rénales de veau non infectées de virus vaccinal.

4° TITRAGE DE VIRULENCE PAR DILUTION. — Les titrages de virulence des liquides récoltés se font par la recherche de la dilution limite donnant encore un effet cytopathogène. La suspension virulente à titrer est diluée de 10 en 10 dans du milieu de culture sans sérum. L'inoculum est de 0,2 ml ; on inocule cinq tubes par dilution. Après soixante minutes de contact, on ajoute à chaque tube 1,8 ml de milieu à 2 p. 100 de sérum. L'inoculum subit ainsi, au moment de l'inoculation, une dilution de  $10^{-1}$ .

Lors de ces titrages, on constate que l'effet cytopathogène est d'autant plus précoce que la concentration de l'inoculum est plus forte, et ceci de façon très régulière :  $10^{-1}$  : ++++ en deux jours ;  $10^{-2}$  : ++++ en trois jours ;  $10^{-3}$  : ++++ en quatre jours ;  $10^{-4}$  : ++++ en cinq jours ;  $10^{-5}/10^{-6}$  : ++++ en six jours ;  $10^{-7}/10^{-8}$  : ++++ en sept jours. Dans tous les cas, il s'écoule en moyenne trois jours entre l'apparition des premières lésions et la lyse cellulaire totale, pour une dilution donnée. Pendant toute la période d'observation des tubes du titrage, les tubes témoins, faits simultanément, ne doivent présenter aucune altération.

Le titre d'une suspension virulente est exprimé par le logarithme de la dilution qui donne encore un effet cytopathogène, pour un volume de 0,2 ml inoculé dans un tube de culture contenant 2 ml de milieu.

5° ADAPTATION DU VIRUS VACCINAL AUX CULTURES DE CELLULES DE REIN DE VEAU. PASSAGES EN SÉRIE. — Des passages en série du virus vaccinal sur cultures de cellules de rein de veau ont été effectués avec titrage de la virulence des liquides récoltés à chaque

TABLEAU I.

Inoculum	Log.dilution après inocu- lation.	Nombre de jours de culture		produit récolté		Titrage DC/CT (1)
		du passage	total	Désignation		
Lymphe purifiée						$10^{-5}$
Lymphe purifiée	$10^{-1}$	3	3	VV/CRV 1er pass.		$10^{-4}$
VV/CRV (2) 1er pass.	$10^{-2}$	3	6	VV/CRV 2è pass.		$10^{-6}$
VV/CRV 2è pass.	$10^{-3}$	3	9	VV/CRV 3è pass.		$10^{-6}$
VV/CRV 3è pass.	$10^{-4}$	2	11	VV/CRV 4è pass.		$10^{-7}$
VV/CRV 4è pass.	$10^{-5}$	3	14	VV/CRV 5è pass.		$10^{-8}$
VV/CRV	$10^{-6}$	3	17	VV/CRV 6è pass.		$10^{-9}$
VV/CRV 6è pass.	$10^{-7}$	3	20	VV/CRV 7è pass.		$10^{-10}$

(1) DC/CT = Dose cytopathogène en culture de tissus (dilution limite donnant un effet cytopathogène après inoculation de 0,2 ml par tube de  $16 \times 160$  contenant 2 ml de milieu). (2) VV/CRV = Virus vaccinal en culture de rein de veau.



passage. Ces passages mirent en évidence la persistance de l'effet cytopathogène et, semble-t-il, une adaptation du virus aux cultures de rein de veau se traduisant par une élévation du titre de virulence. Les résultats de ces passages et de ces titrages sont résumés dans le tableau I.

#### CONCLUSIONS.

La multiplication du virus vaccinal est obtenue sur cultures de cellules de rein de veau. Il y a une adaptation du virus aux cultures cellulaires, qui se traduit par une augmentation du titre du virus récolté au cours des passages en série. Des travaux en cours portent sur l'utilisation éventuelle d'un tel virus vaccinal de culture comme vaccin antivariolique.

#### RÉSUMÉ.

Par trypsination à froid de rein de veau, des cultures de cellules épithéliales en couche monocellulaire sont obtenues dans un milieu à l'hydrolysate de caséine additionné de sérum de veau.

Sur ces cultures de tissus, la multiplication du virus vaccinal s'accompagne d'un effet cytopathogène caractéristique (en particulier, agglutination des cellules en voie de lyse). Cet effet cytopathogène est utilisé pour le contrôle de la multiplication du virus et le titrage de la virulence du virus récolté (dilution limite cytopathogène).

Cette technique de culture du virus vacinal sur cellules trypsinées de rein de veau permet d'obtenir de grandes quantités de virus hautement virulent.

#### SUMMARY

##### CULTURE OF VACCINIA VIRUS.

##### II. — CULTURE OF THE VIRUS ON MONOLAYER EPITHELIAL CALF KIDNEY CELLS.

Trypsination of calf kidney at low temperature allows to obtain monolayer epithelial cell cultures in Earle medium containing casein hydrolysate and calf serum. On these cultures, vaccinia virus induces a typical cytopathogenic effect (particularly agglutination of lysing cells). This cytopathogenic effect allows to follow the multiplication of the virus, and its titration.

With this technique, it is possible to obtain great amounts of highly virulent virus.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] SUREAU (P.), DODIN (A.) et BRYGOO (E. R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 294.
  - [2] WARREN (J.) et CUTCHINS (E. C.). *Virology*, 1957, **4**, 297.
  - [3] CUTCHINS (E.) et WARREN (J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **97**, 456.
  - [4] DOSTAL (V.). *Behringwerk Mitteil.*, 1957, **33**, 111.
  - [5] BOURDIN (P.), ATANASIU (P.), LÉPINE (P.), JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 581.
  - [6] BODIAN (D.). *Virology*, 1956, **2**, 575.
  - [7] DANIEL (PH.) et DEPOUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 703.
  - [8] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (PH.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654.
  - [9] LÉPINE (P.), DANIEL (PH.), PELMONT (J.) et SLIZEWICZ (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 567.
  - [10] SWIM (H. E.) et PARKER (R. F.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **89**, 549.
  - [11] CRAWORD (J. G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **97**, 341.
  - [12] JUNTARO KAMAHORA et coll. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **97**, 43.
-

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>)

Séance du 8 janvier 1959.

Présidence de M. PRÉVOT.

## COMMUNICATIONS

### RECHERCHES SUR LA DIGESTION DE LA CELLULOSE CHEZ LE TERMITE *SPHAEROTERMES SPHAEROTHORAX*

par J. POCHON, H. DE BARJAC et A. ROCHE.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)

Si, depuis les travaux de B. Grassi et A. Sandrias en 1893, 1897, la digestion de la cellulose chez les termites ne fait aucun doute, son mécanisme, par contre, n'est pas encore parfaitement connu.

Nous avons entrepris l'étude du problème (1) avec un termite constructeur de meules sans champignons, *Sphaerotermes sphaerothorax*, de biologie très particulière (Grassé et Noirot) [1].

L'ensemencement de fragments de meules noires ou de meules claires sur milieu liquide, en anaérobiose, a montré l'existence de bactéries cellulolytiques anaérobies banales, *Clostridium* et *Plectridium*, du même type que celles trouvées dans le sol. L'ensemencement des mêmes fragments en aérobiose, sur silico-gel-papier, a également permis la culture de *Sporocytophaga* et de *Cellvibrio* telluriques.

Les analyses ayant porté sur le contenu du tube digestif ont donné des résultats bien différents et beaucoup plus intéressants.

L'examen microscopique direct, à l'état frais et après coloration, donne une image qui évoque une certaine ressemblance avec un contenu de panse de ruminant, au point de vue bactérien évidemment : très nombreux germes de petite dimension, dont certains mobiles, cocci et cocobacilles, le plus souvent non colorables par la méthode de Gram ; extrême rareté des grosses bactéries sporulées. Cependant certaines différences importantes sont à noter : ici, absence

(1) Sur la demande de MM. P.-P. Grassé et C. Noirot, qui nous ont fourni les termites vivants ainsi que les prélèvements de meules. Nous leur en exprimons toute notre gratitude.

de groupements streptococciques, à chaînettes courtes et bifurquées ou longues et flexueuses, abondances des spirilles, des spirochètes et des fusiformes (fig. 1).

Les essais de culture sur silico-gel-papier pour germes aérobies ont été négatifs, négatifs également avec un milieu liquide pour anaérobies cellulolytiques telluriques ; s'il existe une microflore cellulolytique, elle est donc spécialement adaptée au tube digestif hôte. Nous avons alors utilisé un milieu voisin de celui qui nous avait été favorable pour l'isolement de bactéries du tube digestif des rongeurs et des larves xylophages (Pochon, 1935, 1936, 1937 [2]) : extrait fécal, 100 ml ; extrait de terre, 100 ml ; eau distillée, 800 ml ; cellulose broyée ou feuille de papier filtre. Après ensemencement les tubes sont désaérés et scellés sous vide. La cellulose est attaquée en douze jours ; très nombreux cocci, surtout en groupements diplococciques, bâtonnets fins et granuleux, quelques vibrions ; très rares bactéries sporulées ou spores libres ; l'aspect des lames évoque une

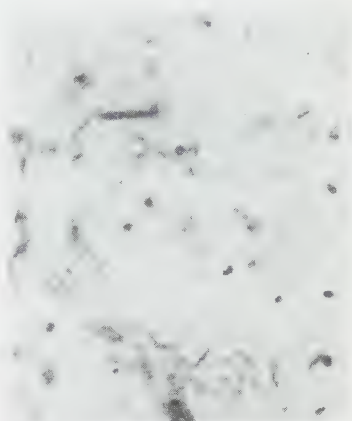


FIG. 1. — Frottis du contenu intestinal.

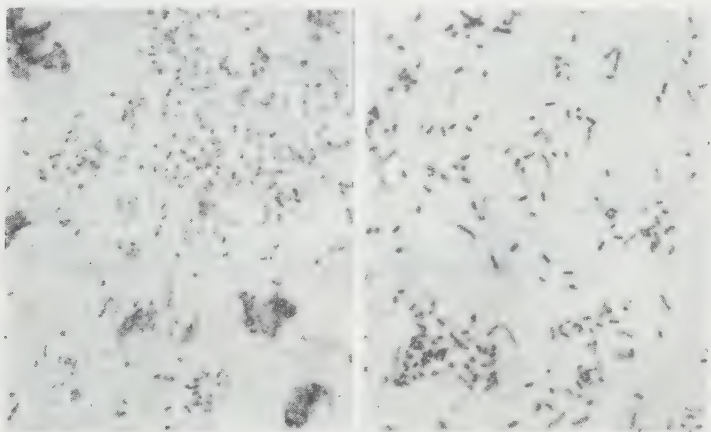


FIG. 2. — Microflore bactérienne cellulolytique non sporulée.

ressemblance nette avec la microflore cellulolytique d'enrichissement décrite par Sijpenstein (1948 [3]), à partir du rumen (fig. 2).

Un deuxième passage sur ce milieu présente des caractères ana-

logues, mais le délai de cellulolyse s'est allongé (trois semaines) ; le milieu de culture est alors modifié ; après de multiples essais négatifs, la formule suivante, inspirée de Sijpenstein, a été retenue : solution saline standard de Winogradsky, 50 ml ; phosphate biammonique, 0,4 g ; extrait de terre, 100 ml ; eau distillée, 850 ml : cellulose broyée ou feuille de papier filtre ; au moment de l'ensemencement on ajoute 1 p. 1 000 d'acide ascorbique, puis on désaère et scelle sous vide ; sur ce milieu la suite des passages a été possible. L'examen microscopique

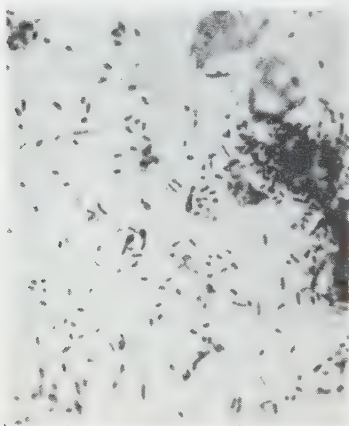


FIG. 3. — Microflore bactérienne cellulolytique. Envahissement par bactéries sporulées.

des lames montre les mêmes espèces morphologiques, avec tendance, surtout en présence de feuille de papier filtre, à l'envahissement par des bactéries sporulées (fig. 3). Nous nous trouvons donc en présence d'un complexe bactérien instable, avec les mêmes caractères morphologiques et évolutifs que ceux observés par Hungate et par Sijpenstein pour le complexe bactérien du rumen et dans lequel ils avaient cru pouvoir dissocier les genres *Ruminobacter* et *Ruminococcus*, déniaient tout rôle aux bactéries sporulées. Tous nos essais d'isolement ont été infructueux : les colonies uniques prélevées ne régénèrent que des bactéries sporulées clostridiennes et plectridiennes.

Le résultat capital de cette étude est donc que la digestion bactérienne de la cellulose, chez cette espèce de termite, pose exactement les mêmes problèmes que chez les ruminants ;

il ne saurait être question de les discuter ici (Pochon, 1953 [4]), mais seulement de souligner le très remarquable phénomène de convergence physiologique chez des êtres vivants pour lesquels la cellulose représente la ration alimentaire de base et qui sont dépourvus de cellulase : une symbiose bactérienne complexe (associée ou non à des protozoaires), en équilibre instable dès que les microorganismes sont sortis du milieu intestinal hôte.

Un dernier point reste à préciser : quel est le métabolisme biochimique de l'association bactérienne ? En d'autres termes, sous quelle forme énergétique la cellulose est-elle absorbée par l'hôte ? Ces problèmes ont été très longuement étudiés et comparés chez les termites et les ruminants (Hungate, 1946 [5]).

Dans le cas de nos cultures cellulolytiques, l'analyse chromatographique sur papier a montré l'absence d'acides organiques fixes (en particulier lactique et succinique) et la présence d'acides volatils, essentiellement acétique et butyrique ; de cette constatation on ne peut d'ailleurs inférer de façon certaine ce qui se passe dans le tube digestif : les équilibres biochimiques sont aussi instables que les équi-



libres microbiens. Bien que l'absorption et l'utilisation de ces acides par les termites soient encore controversées, il semble bien qu'il faille s'orienter vers un mécanisme de nutrition ici encore très voisin de celui qui est maintenant universellement admis pour les ruminants.

### SUMMARY

STUDIES ON THE DIGESTION OF CELLULOSE BY TERMITES  
(*Sphaerotermes sphaerothorax*).

The morphology, physiology and evolution of the cellulolytic intestinal flora in the species studied show marked similitudes with that present in the rumen of cattle.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRASSÉ (P.-P.) et NOIROT (C.). *Ann. Sci. nat. zool.*, 1948, sér. **41**, 150.
- [2] POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **55**, 676 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **202**, 1538 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 870 ; **126**, 854.
- [3] SIFPENSTEIN (K.). *Cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle*. Thèse, Leyde, 1948.
- [4] POCHON (J.). *Rev. Ferm. et Ind. alim.*, 1953, **8**, nos 1 et 2.
- [5] HUNGATE (R. E.). *J. Elisha Mitchel Sci.*, 1946, **67**, 9.

## ACTION DE LA TRUFFE (*TUBER MELANOSPORUM*) SUR LA MICROFLORE TELLURIQUE

par M. A. CHALVIGNAC, C. TYSSET et J. POCHON.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol,  
et Laboratoire de Biologie, section technique de l'Armée)

Innombrables sont les travaux consacrés à l'action antibiotique ou plus simplement inhibitrice de champignons vis-à-vis d'autres micro-organismes du sol ou même de végétaux (sans que cela implique qu'ils soient pathogènes).

Nous étudions ici le cas très particulier de la truffe (*Tuber melanosporum*) ; particulier par son habitat tout d'abord, car, si elle peut être trouvée sous genévrier (*Juniperus*), églantier (*Rosa avensis*), pin (*Pinus*), buis (*Buxus*), noisetier (*Corylus*), vigne (*Vitis*), le chêne, surtout le chêne pédonculé (*Quercus pedunculata*), représente son site d'élection ; particulier aussi, car elle détermine parfois une inhibition

quasi totale, dans un périmètre bien défini, de toute végétation spontanée.

Le but précis de ce travail est de rechercher les incidences éventuelles de ces phénomènes sur la microflore du sol.

Les prélèvements ont été faits dans le Sud-Ouest de la France, région du Quercy (Castelnau Montratier Lot), d'une part sous *Q. pedunculata*, truffier, en zone où toute végétation spontanée est inhibée, d'autre part à 5 m de la périphérie de cette zone (témoin). La délimitation de la zone d'inhibition est très aisée du fait de l'absence totale de toutes les espèces végétales croissant spontanément à proximité parmi lesquelles ont été relevées : *Fetuca ovina*, *Lavandula vulgaris*, *Taraxacum dens leonis*, *Echinum vulgare*, *Tussilago farfara*, *Hieracium pilosella*, *Seriola cœnensis*, *Campanula rotundifolia* (noter la polyvalence de l'inhibition végétale).

Il s'agit d'un sol dont la composition minérale est la suivante :  $\text{SiO}_2$ , 76 à 78 p. 100 ;  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 11 à 12 p. 100 ;  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , 7 à 8 p. 100 ;  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , 1,8 p. 100 (noter la richesse en fer, ce sol a d'ailleurs une teinte rouge accentuée). L'analyse organique a été réalisée dans les deux zones :

ZONE TRUFFIÈRE		ZONE TÉMOIN	
Carbone organique..	0,43 %	Carbone organique..	0,7 %
Azote total.....	0,1 %	Azote total.....	0,13 %
Matières humiques..	0,17 %	Matières humiques..	0,23 %

Le pH est au voisinage de la neutralité (6,8 en zone truffière ; 6,5 dans le témoin).

Toutes les analyses chimiques et biologiques ont porté sur des prélèvements effectués à 10 cm de profondeur.

ANALYSE MICROBIOLOGIQUE. — La microflore totale est dix fois plus abondante dans la zone témoin (80 millions/g terre) que dans la zone truffière (technique en milieu liquide, Chalhagnac [4]).

Les principaux groupements microbiens du cycle de l'azote et du carbone ont été testés (techniques Pochon et coll. [2]).

Fixateurs d'azote aérobies (*Azotobacter*) : 80/g en zone truffière, 1 100/g en zone témoin.

Fixateurs d'azote anaérobies (*Clostridium*) : 4 500/g en zone truffière, 11 000/g en zone témoin.

Ammonificateurs (voir les courbes fig. 1) : ils sont un peu plus actifs en zone témoin.

Protéolytiques (voir les courbes fig. 1) : ils sont beaucoup plus actifs en zone témoin.

Nitrificateurs : différences minimales entre les deux zones, cependant en faveur du témoin ; les dilutions limites de nitrification se situent vers  $10^{-3}$  ; de nitrification, vers  $10^{-4}$ .

Dénitrificateurs (voir les courbes fig. 1) : ils sont plus actifs en zone témoin.

Amylolytiques (voir les courbes fig. 1) ; activité légèrement supérieure dans la zone témoin.

Cellulolytiques (technique de Barjac [3]) : en zone témoin les aérobies sont dix fois plus nombreux, les anaérobies mésophiles cent fois plus (de l'ordre 110 000/g).

CONCLUSION. — On note donc, dans l'ensemble, une diminution nette de l'activité biologique du sol dans la zone truffière par rapport au témoin ; cette diminution porte sur la microflore totale et aussi

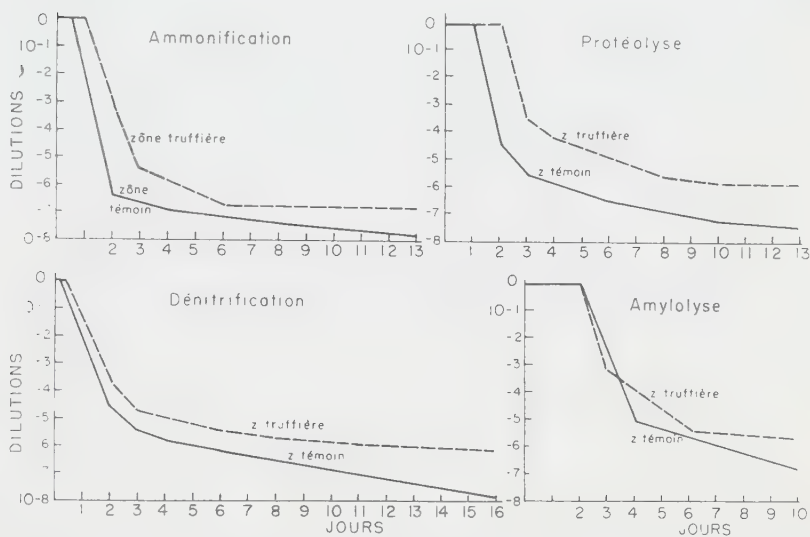


FIG. 1. — Courbes d'ammonification, protéolyse, dénitrification, amylolyse.

sur presque tous les groupements microbiens physiologiques des cycles de l'azote et du carbone.

Dans l'état actuel du problème, deux interprétations peuvent être envisagées :

a) Le champignon truffier a une action inhibitrice (antibiotique?) sur la microflore du sol, de même type que celle qu'il manifeste sur la végétation spontanée ;

b) La diminution de la microflore tellurique en zone truffière est seulement en rapport avec l'absence d'effet rhizosphère, puisque cette zone est totalement dépourvue de végétation.

### SUMMARY

#### ACTION OF THE TRUFFLE (*Tuber melanosporum*) ON TELLURIC MICROFLORA.

The biological activity is significantly decreased in soils where truffles grow. The total microflora and almost all physiological microbial groups responsible for nitrogen and carbon cycles are implied in this decrease.

Two explanations can be proposed :

a) The truffle has an inhibitory (antibiotic?) activity on the soil microflora (activity of the same type as the one it possesses on natural vegetation) ;

b) The decrease of the telluric microflora in truffle zones is only due to the absence of rhizosphere effect, since these zones are totally deprived of vegetation.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [4] CHALVIGNAC (M.-A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 602.  
 [2] POCHON (J.) et coll. *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*, Masson, édit., Paris, 1954.  
 [3] BARJAC (H. DE). *Pédologie* (Gand), 1957. *Symposium de techniques*, p. 166.

### DÉGAGEMENT D'AMMONIAC PAR LA MICROFLORE DE CERTAINES RHIZOSPHERES EN MILIEU LIQUIDE

par N. BALICKA, H. DE BARJAC et J. POCHON.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol).

Il existe diverses techniques de mesure du pouvoir ammonifiant, basées sur le dégagement de  $\text{NH}_3$  à partir de substances protéiques, par la microflore du sol. Cette mesure peut se faire en terre (Pochon et Tchan [4] ou en milieu liquide (de Barjac et Pochon [2]. Différents substrats peuvent être employés en terre (urée, poudre de sang, farine de légumineuses), comme en milieu liquide (tyrosine, asparagine). Suivant la nature du substrat employé, l'amplitude et l'allure du dégagement de  $\text{NH}_3$  varient.

Il nous a paru intéressant de comparer ici le dégagement de  $\text{NH}_3$  par diverses microflores en présence soit de tyrosine, soit d'asparagine en milieu liquide. Le but était de voir si l'évolution général du phénomène était fondamentalement identique ou, au contraire, différente. Les microflores testées sont calquées sur celles analysées lors de nos expériences antérieures, publiées par N. Balicka [3]. Elles correspondent respectivement à la rhizosphère proche du seigle, à la rhizosphère proche de la vesce, à la rhizosphère proche de seigle + vesce en culture mixte, enfin au témoin sans culture.

TECHNIQUES. — Quatre séries de pots ont été mis en culture, à raison de trois répétitions par série :

- 1° Pots témoins, sans plantes ;
- 2° Pots avec seigle ;
- 3° Pots avec vesce ;
- 4° Pots avec seigle + vesce.

Chaque pot est stérilisé avec 500 g de sable humidifié à l'aide de 80 ml d'extrait de terre + 150 ml de solution saline suivante :  $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ , 0,4 g ;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 0,25 g ;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,16 g ;  $\text{NO}_3\text{K}$ , 0,09 g ;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 0,08 g ;  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , 1 goutte ; solution d'oligo-éléments, 1 ml ; eau distillée, 1 000 ml. Avant stérilisation, on enfonce dans chaque pot, à l'opposé, deux tubes de verre bouchés au coton, qui serviront à ajouter stérilement telle ou telle solution.

Après stérilisation, chaque pot reçoit son inoculum microbien sous forme de 5 g de sol mis en suspension dans 10 ml d'eau stérile. L'inoculation se pratique par l'intermédiaire d'un des tubes de verre précités. Le sol choisi est une terre fertile de jardin, en bon état, afin d'avoir une micro-flore suffisamment représentative.

Trois pots sont laissés à nu. Trois sont ensemencés par des graines de seigle, trois par des graines de vesce et trois par des graines de seigle

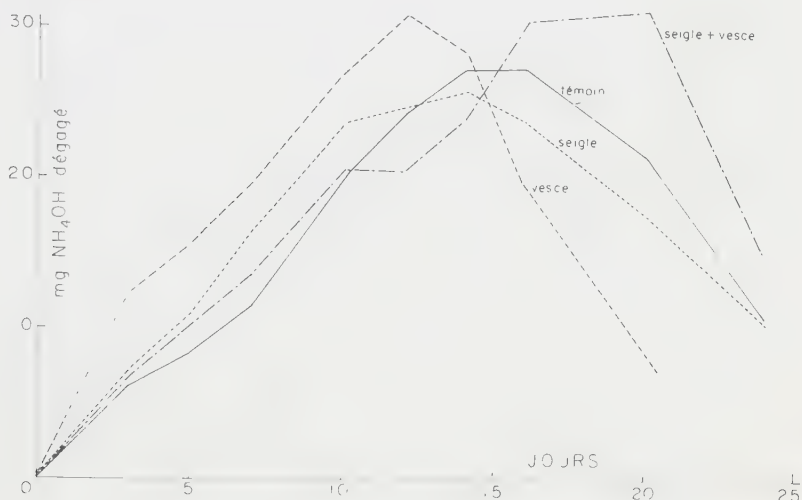


FIG. 1. — Ammonification sur tyrosine.

+ graines de vesce. Toutes les graines sont, au préalable, stérilisées en surface par immersion dans  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  à 1 p. 1 000 suivie de lavages à l'eau distillée stérile. Après pré-germination à l'étuve à 28° C sur rondelles de papier filtre humidifiées stériles, en boîtes de Petri, ces graines sont disposées dans les pots.

Après sept semaines de culture, poursuivie en maintenant l'humidité à poids constant, des prélèvements sont effectués dans tous les pots des quatre séries. Chaque série est ensuite ramenée à 40 g d'échantillon moyen, ces 40 g correspondant soit au sable nu (dans la série témoin), soit (dans les autres séries) à la rhizosphère proche des cultures, c'est-à-dire racines + sable adhérent.

Les quatre séries de prélèvements moyens sont, alors, ensemencées dans un milieu liquide à substrat ammonifiable. Dans un cas, on emploie, comme milieu, la formule suivante : solution de Winogradsky, 50 ml ;



tyrosine, 0,5 g ; eau, 950 ml. Dans l'autre cas, on emploie : solution de Winogradsky, 50 ml ; asparagine, 0,2 g ; eau, 950 ml. Ces deux milieux sont stérilisés, le premier par filtration sur bougie, le second à l'autoclave.

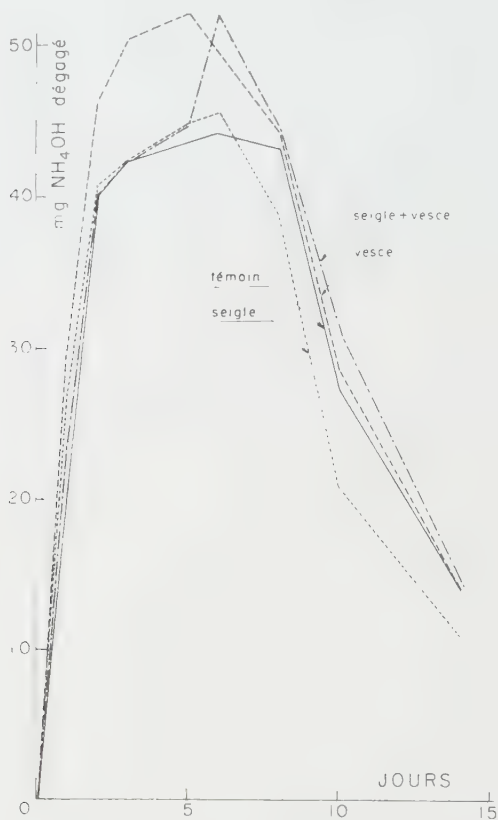


FIG. 2. — Ammonification sur asparagine.

On ensemence chacun d'eux, à raison de 500 ml en fioles, par 20 g de prélèvement. Incubation à 28° C.

Chaque jour, on dose l'ammoniac dégagé par la technique de Drouineau [4].

**RÉSULTATS.** — Les figures 1 et 2 groupent les résultats obtenus avec les différentes microflores, d'une part sur la tyrosine, d'autre part sur l'asparagine. Les courbes permettent de constater que :

1° Dans les deux cas, le dégagement de  $\text{NH}_3$  est progressif, la quantité de  $\text{NH}_3$  libéré augmentant à partir du premier jour d'incubation pour atteindre son maximum entre trois et six jours dans le cas de l'asparagine, entre dix et douze jours dans le cas de la tyrosine.

Après cet apex, la quantité de  $\text{NH}_3$  trouvé diminue. L'explication en peut résider soit dans la réutilisation de l'ammoniac par la microflore en expérience, soit dans l'oxydation microbiologique de cet ammoniac en nitrites ou en nitrates, l'un n'excluant d'ailleurs pas l'autre. Une preuve en faveur de la seconde hypothèse est apportée par la caractérisation des nitrites et des nitrates qui a été positive en milieu asparagine, après les délais suivants :

	NITRITES	NITRATES
Série témoin .....	+ au 6 <sup>e</sup> jour	+ au 8 <sup>e</sup> jour
Série seigle .....	+ au 5 <sup>e</sup> jour	+ au 8 <sup>e</sup> jour
Série vesce .....	+ au 6 <sup>e</sup> jour	+ au 8 <sup>e</sup> jour
Série seigle + vesce .....	+ au 6 <sup>e</sup> jour	+ au 8 <sup>e</sup> jour

Ceci concorde avec les observations de Fisher [5] et de Chalignac [6].

2° Le dégagement de  $\text{NH}_3$ , en milieu asparagine, est plus rapide et plus élevé qu'en milieu tyrosine. Mais il faut souligner que, malgré ces différences, le classement des microflores, d'après leur activité ammonifiante, suit exactement le même schéma, qu'il s'agisse de la tyrosine ou de l'asparagine. En ordre croissant d'activité, au début, nous avons toujours : témoin, seigle + vesce, seigle, vesce. La différence est encore plus sensible en présence de tyrosine.

3° Le maximum de pouvoir ammonifiant appartient au cas de la microflore rhizosphérique de la vesce, ce qui confirme les résultats de nos expériences antérieures [3].

4° La courbe de dosage, donnée par la microflore rhizosphérique mixte seigle + vesce, apparaît moins régulière que les autres. Au début, elle suit la progression des courbes du témoin sans culture et de la culture seigle. Ensuite, dans les deux cas, elle aligne son maximum avec celui de la culture vesce.

Il semble que cela indique que dans la culture mixte, seigle + vesce, coexistent deux types de microflore qui atteignent successivement leur maximum, du point de vue pouvoir ammonifiant.

## SUMMARY

### RELEASE OF $\text{NH}_3$ BY THE MICROFLORA OF CERTAIN RHIZOSPHERES IN LIQUID MEDIUM.

A comparison of  $\text{NH}_3$  release by various microflorae in presence of tyrosin or asparagin in liquid medium.

Four types of microflora are studied : the first one (control) is the microflora of a garden soil ; the second one, that of a rye-rhizosphere ; the third one, that of a vesce-rhizosphere ; the fourth one, that of a mixed rye and vesce-rhizosphere.

The classification of the microflorae according to their ammonifying capacity is the same with the two substrates (tyrosin or asparagin). The nature of this substrate influences the amount of  $\text{NH}_3$  released and the rate of the process.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] POCHON (J.) et TCHAN (Y. T.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 696.  
[2] BARJAC (H. DE) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **86**, 82.  
[3] BALICKA (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 480.  
[4] DROUINEAU (G.). *Ann. Agr.*, 1947, **2**.  
[5] FISHER (T.), FISHER (E.) et APPLEMAN (H. D.). *J. gen. Microb.*, 1956, **54**, 238.  
[6] CHALVIGNAC (M. A.) (communication orale).
- 

## LE FACTEUR SÉRIQUE Gm<sup>a</sup> DANS LE SÉRUM D'ANIMAUX DE DIFFÉRENTES ESPÈCES

par M<sup>me</sup> L. PODLIACHOUK.

(Institut Pasteur,  
Centre d'Etudes des Groupes Sanguins des Animaux)

Le caractère de spécificité antigénique des protéines sériques est généralement lié à l'espèce.

Peu d'entre elles varient à l'intérieur de l'espèce et on ne connaît encore à présent que deux systèmes de groupes sériques chez l'homme :

1° Le système « haptoglobine » dans les globulines  $\alpha_2$  (Smithies et Walker, 1955) par l'électrophorèse en gel d'amidon ;

2° Le système Gm<sup>a</sup> dans les globulines  $\gamma$  (Grubb et Laurell, 1956 [2, 3]) par une technique sérologique.

Foz et coll. (1954), puis Waller et Vaughan (1956), ont observé que certains sérums de malades atteints de polyarthrite chronique évolutive agglutinent les globules rouges humains ORh-positifs sensibilisés avec un sérum anti-Rh (anti-D) incomplet.

Heller et coll. (1954), étudiant différents sérums humains et animaux pour intensifier la réaction dite de Waaler-Rose, ont observé que certains sérums humains inhibent partiellement cette hémagglutination.

Grubb et Laurell [3] ont constaté que la globuline  $\gamma$  humaine et le sérum d'environ 60 p. 100 de la population suédoise sont capables d'inhiber la réaction d'agglutination de globules rouges ORh-positifs (sensibilisés à l'aide d'anti-Rh sélectionné) par certains sérums de malades atteints de polyarthrite chronique évolutive. Ils ont en outre observé que 95 p. 100 des Esquimaux sont Gm (a+).

En France, Moullec et coll. [5] ont trouvé 54,3 p. 100 de sujets Gm (a+) parmi les habitants du département d'Indre-et-Loire. Avec Jacqueline et Eyquem [7] nous avons trouvé 57,3 p. 100 chez les Parisiens, tandis que Hurel et Ropartz [4] en signalent 51,7 p. 100 en Seine-Maritime.

Le facteur sérique G<sup>ma</sup> (dénomination introduite par Grubb) qui se trouve parmi les globulines  $\gamma$  est responsable de cette inhibition. Il est héréditaire et est probablement déterminé par un couple de gènes alléomorphes G<sup>ma</sup> et G<sup>m</sup>.

Nous avons recherché l'existence du facteur sérique G<sup>ma</sup> dans le sérum d'animaux de différentes espèces. Les hétéro-agglutinines anti-homme existant dans le sérum des animaux, à un titre plus ou moins élevé, peuvent agglutiner les globules rouges humains ORh-positifs sensibilisés. Les épreuves d'inhibition dans la recherche du G<sup>ma</sup> ont été réalisées après absorption des hétéro-anticorps comme suit : le sérum à examiner, après un chauffage à 56° C pendant trente minutes, est mis en contact pendant deux heures, à la température du laboratoire, avec un volume égal de culot de globules rouges humains de n'importe quel groupe (lavés préalablement quatre fois avec de l'eau physiologique). On contrôle l'absorption complète des hétéro-hémagglutinines dans la fraction du sérum recueillie après centrifugation. Si l'absorption n'est pas complète, on répète l'opération (comme ci-dessus). La technique de la recherche du G<sup>ma</sup> a été décrite antérieurement [7].

L'étude des globulines  $\gamma$  du cheval, bœuf, mouton et porc a montré qu'elles ne peuvent inhiber l'agglutination des globules rouges humains sensibilisés, provoquée par un sérum de polyarthrite chronique évolutive, c'est-à-dire qu'elles ne contiennent pas le facteur sérique G<sup>ma</sup>.

Nous avons examiné le sérum de 25 chevaux, 23 bovins, 11 ânes, 16 porcs, 20 moutons, 20 chiens, 2 chats, 12 poules, 18 lapins, 14 cobayes, 12 rats, 12 souris et 44 singes [17 cynocéphales, 1 *Macacus rhesus* et 26 chimpanzés (1)].

Le sérum (après l'absorption des hétéro-anticorps) a été examiné : non dilué, dilué à 1/5 et à 1/10. Nous avons constaté qu'à l'exception de celui des 26 chimpanzés, aucun des sérums examinés ne contient le facteur G<sup>ma</sup>.

Le sérum de tous les chimpanzés étudiés s'est révélé comme possédant le caractère des sérums humains G<sup>m</sup> (a+). La concentration du G<sup>ma</sup> dans le sérum de ces chimpanzés est un peu plus faible que chez l'homme. En effet, ce sérum n'est capable d'inhiber la réaction d'hémagglutination que lorsqu'il est dilué à 1/5, tandis que le sérum humain l'est encore dans une dilution à 1/10, 1/20 et plus (tableau I).

Comme chez l'homme, la présence du facteur G<sup>ma</sup> est constante chez les chimpanzés adultes. Nous avons examiné à plusieurs reprises quelques-uns de ces animaux, et obtenu chaque fois les mêmes résultats.

On peut supposer que l'impossibilité de déceler le facteur G<sup>ma</sup> chez la plupart des animaux est attribuable à la fixation des globulines  $\gamma$ , qui le déterminent, lors de l'absorption des hétéro-anticorps.

Pour vérifier cette supposition, nous avons absorbé les hétéro-hémag-

(1) Les échantillons de sang des chimpanzés ont été adressés au Laboratoire d'Hématologie par l'Institut Pasteur de Kindia (Directeur : M. Lefrou) grâce à l'intervention de M. Vancel. L'étude de leurs antigènes et groupes sanguins sera publiée ultérieurement.

glutinines anti-mouton du sérum de deux sujets Gm (a+) et avons déterminé le taux de Gm<sup>a</sup> existant dans le sérum avant et après l'absorption. Nous n'avons pas trouvé de différence notable.

TABLEAU I.

DILUTION du SÉRUM	1	5	10	20	40
Homme	—	—	—	—	++
Chimpanzé	—	—	++	+++	+++
Cynocéphale	+++	+++	+++	+++	+++

— inhibition (présence du facteur Gm<sup>a</sup>); + hémagglutination (absence du facteur Gm<sup>a</sup>).

La présence du facteur Gm<sup>a</sup> dans le sérum des chimpanzés apporte une preuve de plus de l'étroite parenté existant entre les protéines sériques de ces derniers et celles de l'homme.

RÉSUMÉ. — La recherche du facteur sérique Gm<sup>a</sup> dans le sérum des chevaux, bovins, ânes, porcs, moutons, chiens, chats, poules, lapins, cobayes, rats, souris et singes (cynocéphales et chimpanzés) n'a révélé sa présence que dans le sérum des chimpanzés étudiés.

## SUMMARY

THE FACTOR Gm<sup>a</sup> IN THE SERUM OF VARIOUS ANIMAL SPECIES.

Sera of bovines, horses, donkeys, pigs, sheep, dogs, cats, chicken, guinea-pigs, rats, mice, monkeys (cynocephalus and chimpanzees) have been examined for the presence of the factor Gm<sup>a</sup>. This factor was present in chimpanzees serum only.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] EYQUEM (A.), POBLIACHOUK (L.) et JACQUELINE (F.). *Communication n° 37, VII<sup>e</sup> Congrès Soc. Int. Transf. sang.*, Rome, 1958. Karger, édit. (*sous presse*).
- [2] GRUBB (R.). *Acta pathol. microbiol. scand.*, 1956, **39**, 195.
- [3] GRUBB (R.) et LAURELL (A.B.). *Acta. pathol. microbiol. scand.*, 1956, **39**, 390.
- [4] HUREL (R.) et ROPARTZ (C.). *Rouen méd.*, 1957, **31**, 10.
- [5] MOULLEC (J.), KHERUMIAN (R.), SUTTON (E.) et ESPAGNON (P.). *Rev. Hématol.*, 1956, **41**, 512.
- [6] POBLIACHOUK (L.) et EYQUEM (A.). *Communication n° 247, VII<sup>e</sup> Congrès Soc. Int. Transf. sang.*, Rome, 1958. Karger, édit. (*sous presse*).
- [7] POBLIACHOUK (L.), JACQUELINE (F.) et EYQUEM (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 590.



## RECHERCHES SUR L'IMMUNISATION DE LA BREBIS CONTRE LA MAMMITE STAPHYLOCOCCIQUE

par J. PILLET O. GIRARD, H. DUTHEIL et B. ORTA (\*).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

Nous avons recherché au cours de différentes séries d'expériences quelle était la valeur préventive d'une vaccination anti-staphylococcique (vaccin mixte : anatoxines  $\alpha$  et  $\beta$  et corps microbiens sélectionnés) à l'égard de la mammite expérimentale de la brebis.

Dans une première série d'essais, nous avons utilisé la voie intramusculaire en employant des doses importantes de vaccin en injections répétées (12 injections en moyenne, doses croissantes de 1 à 20 cm<sup>3</sup>).

Les résultats immunologiques de ces expériences ont été très satisfaisants (augmentation remarquable des antitoxines  $\alpha$  et  $\beta$  et élévation nette mais moins marquée des agglutinines), mais la résistance des animaux vaccinés à l'infection provoquée s'est avérée trop irrégulière pour que ce mode d'immunisation puisse être considéré comme satisfaisant, tout au moins vis-à-vis de l'infection expérimentale.

Il y a lieu de noter en effet, à ce propos, que l'infection expérimentale que nous provoquons, et dont la technique sera décrite plus loin, est manifestement plus brutale et plus massive que celle qui peut se produire dans les conditions naturelles.

C'est pourquoi, bien que la vaccination par voie intramusculaire ne semble pas suffisante pour protéger régulièrement l'animal contre la mammite expérimentale, il conviendra de rechercher si ce mode de vaccination ne permet cependant pas à la brebis de lutter avec succès contre l'infection très vraisemblablement légère qui est à l'origine de la mammite spontanée.

Quoi qu'il en soit, à la suite de ces résultats et d'observations fortuites (animaux résistants à l'infection expérimentale après injection d'une première dose infectante insuffisante), nous avons tenté, d'autre part, l'immunisation de la brebis par voie locale en injectant le vaccin au niveau du tissu mammaire par l'intermédiaire du canal du trayon.

Ce sont les résultats particulièrement encourageants d'expériences faites en suivant cette technique qui font l'objet de cette note.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — *Vaccin*. — Emulsion dans un mélange d'anatoxines  $\alpha$  et  $\beta$  contenant au centimètre cube 10 U. I. de chacune des anatoxines, de corps microbiens tués provenant des souches de staphylocoques types I, III, 8 et de trois souches de staphylocoques pathogènes isolées

(\*) Cette note avait été déposée sous pli cacheté à la séance de la Société Française de Microbiologie du 5 janvier 1956, pli ouvert à la séance du 8 janvier 1959.

sur la brebis et productrices des deux toxines  $\alpha$  et  $\beta$  (souches nos 90, 131, 684) [1, 2].

Afin de prévenir tout accident infectieux immédiat, provoqué par le traumatisme vaccinal, le vaccin est additionné au moment de l'emploi de 100 000 U. de pénicilline par centimètre cube de vaccin.

*Brebis.* — Les brebis ont été vaccinées et testées en pleine période de lactation, soit un à deux mois après la mise bas (1).

*Vaccination.* — a) *Méthode.* Injection par le canal du trayon à l'aide d'une sonde de 3 cm ; celle-ci est introduite complètement dans le canal et l'injection se fait au contact du tissu mammaire.

b) *Nombre et intervalles des injections.* Les injections sont faites dans chacun des deux trayons à quatre jours d'intervalle, la série étant de trois à quatre injections successives.

c) *Doses de vaccin injecté.* Nous avons injecté 1 cm<sup>3</sup> de vaccin dans chaque trayon, soit 2 cm<sup>3</sup> au total pour chacune des vaccinations. La série totale nécessite donc 6 à 8 cm<sup>3</sup> de vaccin par animal.

*Infection provoquée.* — a) *Méthode.* Injection dans chaque trayon par la même technique que celle utilisée lors de la vaccination, de 1 cm<sup>3</sup> d'une émulsion d'une culture de 18 heures de staphylocoques  $\alpha$ ,  $\beta$  toxigènes provenant d'une souche isolée sur la brebis au cours d'une mammite spontanée (n° 90). L'émulsion est préparée de la façon suivante : les staphylocoques provenant d'une culture en stries serrées sur gélose (tube à essai de 17 mm de diamètre) sont émulsionnés dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique.

b) *Date.* L'infection expérimentale a été provoquée suivant les expériences, une à trois semaines après la fin des vaccinations.

*RÉSULTATS.* — Les résultats sont résumés dans le tableau ci-joint, dans lequel nous avons adopté les abréviations suivantes : « Mammite + » qui correspond à une mammite caractérisée allant de l'engorgement massif de la mamelle avec noyaux indurés, à l'escarre avec sphacèle d'une fraction plus ou moins importante de la mamelle. Ces lésions s'accompagnent très généralement d'arrêt total de la lactation. « Mammite  $\pm$  » qui correspond à une légère augmentation de volume de la mamelle avec induration modérée et érythème. Cette forme qui s'accompagne de petits troubles de la lactation évolue en général rapidement et se termine en cinq à six jours sans laisser de séquelles.

L'examen du tableau montre clairement que l'introduction de vaccin mixte spécifique par voie locale a pour effet de rendre la mamelle réfractaire à l'infection staphylococcique expérimentale, tout au moins lorsque celle-ci est provoquée une à trois semaines après la fin de la vaccination.

Nous n'avons pu, en effet, étant donné le petit nombre d'animaux mis à notre disposition, expérimenter jusqu'à maintenant que selon ce seul protocole.

Différents points seront à préciser ultérieurement parmi lesquels il faut citer :

- 1° La détermination de la durée de cet état réfractaire ;
- 2° Le mécanisme de cette action protectrice ; la première hypothèse

(1) Les brebis utilisées dans ces recherches ont été fournies par la Société des Caves de Roquefort, que nous tenons à remercier ici. C'est en effet grâce au soutien matériel (animaux) et à l'esprit d'étroite collaboration de la Direction de la Société des Caves que ce travail a pu être effectué.

venant à l'esprit étant celle de l'établissement d'un état d'immunisation local.

Notons pour terminer que l'adjonction de pénicilline au vaccin nous a été imposée par la constatation de deux mammites survenues au cours des expériences 3 et 4, ces mammites étant très probablement provoquées par le transport au niveau du tissu mammaire au cours de la vaccination, de germes végétant habituellement au niveau du trayon. L'expérience 5 dans laquelle nous avons utilisé le vaccin additionné de pénicilline s'est déroulée sans aucun accident, ce qui confirme dans une certaine mesure ce point de vue.

Expérience n°	TÉMOINS				VACCINÉS			
	Nombre d'animaux	Mammites			Nombre d'animaux	Mammites		
		+	+	0		+	+	0
I	5	4	0	I	6	0	2	4
2	2	2	0	0	4	0	0	4
3	2	2	0	0	2	0	0	2
4	2	2	0	0	2	0	0	2
5	4	4	0	0	4	0	I	3
Total	I5	I4	0	I	I8	0	3	I5

Différentes expériences réalisées depuis sur une échelle plus étendue nous ont, par ailleurs, permis de constater que, sous couvert de pénicilline, la vaccination par le canal du trayon était parfaitement réalisable sur le plan pratique et ne présentait pas de danger pour l'animal.

**RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS** — Nous avons constaté au cours d'expériences sur la prévention de la mammite staphylococcique expérimentale de la brebis qu'une vaccination locale pratiquée par l'intermédiaire du canal du trayon à l'aide d'un vaccin mixte (anatoxines  $\alpha$  et  $\beta$  + corps microbiens sélectionnés) permettait de protéger les brebis d'une façon pratiquement constante lorsque l'infection expérimentale était provoquée une à trois semaines après la fin des vaccinations.

Certains points complémentaires seront à étudier ultérieurement : durée de la protection, mécanisme de celle-ci (très vraisemblablement processus d'immunisation local), mais il semble que dès maintenant ces résultats, en dehors de leur incidence pratique, devraient permettre de préciser dans une certaine mesure les rapports hôte-microbes dans le cas des staphylococcies.

## SUMMARY

STUDIES ON IMMUNIZATION OF SHEEP AGAINST EXPERIMENTAL  
STAPHYLOCOCCAL MASTITIS.

A local immunization carried out in the teat duct with a mixed vaccine ( $\alpha$  and  $\beta$  toxoids + selected bacterial cells) protects sheep against a challenge infection realized one to three weeks after the immunization.

Certain problems need further study : duration of protection, mechanism of this protection (probable a local immunization process).

Besides their practical significance, the findings allow to study host-bacteria relationships in the case of staphylococcal infections.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] PILLET (J.), ORTA (B.), ISBIR (S.) et MERCIER (P.). *Bull. Acad. vétér.*, 1950, n° 7, 403.  
[2] PILLET (J.), ORTA (B.), ISBIR (S.) et MERCIER (P.). *Ibid.*, 1950, n° 7, 409.

**TROIS NOUVEAUX SÉROTYPES  
DU GROUPE SALMONELLA ISOLÉS AU CONGO BELGE :  
S. INGANDA (6,7 : z10 : 1,5), S. IPEKO (9,12 : c : 1,6)  
ET S. BOLOMBO (3,10 : z38 : -)**

par E. VAN OYE, C. LUCASSE, V. HERIN et M<sup>lle</sup> M. BEAUFORT.

(*Institut de Médecine Tropicale « Princesse Astrid », Léopoldville*  
[Directeur : D<sup>r</sup> E. VAN OYE], *Laboratoire médical provincial de*  
*Coquilhatville* [Directeur : D<sup>r</sup> C. LUCASSE], *et Service vétérinaire*  
*provincial* [Directeur : D<sup>r</sup> méd. vét. V. HÉRIN])

Les trois nouvelles salmonelles qui seront décrites dans cette note ont toutes été isolées au Laboratoire médical de Coquilhatville, chef-lieu de la Province de l'Equateur au Congo belge.

Deux souches de *S. inganda* proviennent de ganglions mésentériques de deux porcs différents, examinés le même jour. *S. ipeko* a été isolée à trois reprises, deux fois par coproculture chez des indigènes (dont un présentait en même temps une infection à *S. uganda*) et une fois par culture d'un ganglion chez un porc. Enfin, *S. bolombo* a été trouvée une première fois chez un porc, par culture d'un ganglion mésentérique, et une seconde fois chez une poule, par culture de moelle osseuse.

Les propriétés biochimiques de ces trois nouveaux sérotypes sont identiques : il y a fermentation, dans les vingt-quatre heures et avec production de gaz, de l'arabinose, de la dulcité, du glucose, du maltose, de la mannite, du rhamnose, de la sorbite, du tréhalose et du xylose. Ne sont pas attaqués en trente jours : l'adonite, l'inosite, le lactose, le saccharose et la salicine.

Les germes produisent de l'hydrogène sulfuré et réduisent les nitrates. Ils ne se développent pas dans le milieu de Braun au KCN. La réaction de Stern est négative chez les trois types.

Il n'y a pas de liquéfaction de la gélatine, ni production d'indole, ni décomposition de l'urée. La réaction de Voges-Proskauer est négative, celle au rouge de méthyl est positive.

Les cultures se développent en vingt-quatre heures sur le milieu au citrate de soude de Simmons et acidifient le milieu au D-tartrate de Jordan et Harmon.

Les propriétés biochimiques de ces trois nouveaux types sont ainsi caractéristiques pour les membres du groupe *Salmonella* ; leurs caractères culturels et morphologiques le sont également.

La détermination de la structure antigénique n'a pas présenté de difficultés et a pu se faire sans qu'il ait été nécessaire de recourir à la fabrication de nouveaux sérums ou à des absorptions croisées.

1° L'antigène somatique de *S. inganda* est agglutiné par un sérum anti-O : 6, 7, 8 non-absorbé, ainsi que par un sérum anti-O : 7 absorbé ; il ne l'est pas par un sérum anti-O : 8 pur.

L'antigène de la phase flagellaire-1 est agglutiné au titre par un sérum anti-H :  $z_{10}$  à l'exclusion de tous les autres. L'antigène de la phase flagellaire-2 est agglutiné par un sérum non-absorbé anti-H : 1, 2, 5, 6, 7 ainsi que par un sérum absorbé anti-H : 5.

La structure antigénique de *S. inganda* peut donc être représentée par la formule = 6,7 :  $z_{10}$  : 1,5.

2° L'antigène somatique de *S. ipeko* est agglutiné au titre par les sérums anti-O du groupe sérologique D.

L'antigène flagellaire de la première phase est agglutiné uniquement par un sérum anti-H : c ; celui de la seconde phase est agglutiné par un sérum non-absorbé anti-H : 1, 2, 5, 6, 7, ainsi que par le sérum anti-H : 6 pur.

La formule antigénique de *S. ipeko* est donc : 9,12 : c : 1,6.

3° L'antigène somatique de *S. bolombo* est agglutiné par un sérum non-absorbé anti-O du groupe sérologique E, et par un sérum anti-O : 10 pur. Cette *Salmonella* appartient donc au sous-groupe sérologique E. 1.

L'antigène flagellaire est agglutiné au titre par un sérum anti-H :  $z_{38}$ . Des essais en tube de Craigie et sur plaque de Gard avec gélose semi-solide additionnée d'un sérum anti-H :  $z_{38}$  ont montré que ce germe est monophasique. Sa structure antigénique est donc : 3,10 :  $z_{38}$  —.

Nous tenons à remercier le professeur F. Kauffmann, Directeur du Centre International des Salmonellae à Copenhague, qui a bien voulu contrôler ces trois nouveaux sérotypes.



RÉSUMÉ. — Les auteurs signalent la découverte au Congo belge de trois nouveaux sérotypes du groupe *Salmonella*, notamment : *S. inganda* (6,7 :  $z_{10}$  : 1,5), *S. ipeko* (9,12 :  $c$  : 1,6) et *S. bolombo* (3,10 :  $z_{38}$  : —).

## SUMMARY

Three new *Salmonella* serotypes isolated in the Belgian Congo are described, namely *S. inganda* (6,7 :  $z_{10}$  : 1,5), *S. ipeko* (9,12 :  $c$  : 1,6) and *S. bolombo* (3,10 :  $z_{38}$  : —).

**UNE NOUVELLE SALMONELLA  
ISOLÉE AU CONGO BELGE :  
*S. BUKAVU* (1,40 : L,  $z_{28}$  : 1,5)**

par E. VAN OYE, P. VASSILIADIS, P. JANSSEN et G. VAN LOOY.

(Institut de Médecine tropicale « Princesse Astrid », Léopoldville  
[Directeur : Dr E. VAN OYE], et Laboratoire médical provincial de  
Bukavu [Kivu, Congo belge])

La nouvelle *Salmonella* qui sera décrite dans cette note, et qui a reçu le nom de *Salmonella bukavu*, a été isolée par coproculture chez une femme indigène qui souffrait de troubles gastro-intestinaux. L'isolement a été fait au Laboratoire médical de Bukavu, chef-lieu de la province du Kivu au Congo belge.

Le germe possède les caractères culturels et morphologiques usuels d'une *Salmonella* et les propriétés biochimiques suivantes : fermentation, en un jour et avec production de gaz, de l'arabinose, de la dulcité, de l'inosite, du glucose, du maltose, de la mannite, du rhamnose, de la sorbite, du tréhalose et du xylose. L'adonite, le lactose, le saccharose et la salicine ne sont pas attaqués en trente jours.

Le germe produit de l'hydrogène sulfuré et réduit les nitrates. La réaction de Stern est positive après deux jours. Il ne se développe pas dans le milieu de Braun au KCN.

La réaction de Voges-Proskauer est négative, celle au rouge méthyl est positive. La gélatine n'est pas liquéfiée, et l'urée n'est pas décomposée. Il n'y a pas de production d'indole.

On observe les résultats suivants dans les milieux contenant des acides organiques : citrate +<sup>1</sup>, mucate +<sup>2</sup>, D-tartrate X, L-tartrate —<sup>14</sup> et I-tartrate —<sup>14</sup>.

Sur lames, la culture est agglutinée par nos sérums anti-O : 40 et et O : 49. Nous avons préparé ce dernier avec une culture de *S. bula-wayo* chez qui Kauffmann et Deom (1957) avaient signalé la présence,

en plus de l'antigène somatique O : 49, du facteur O : 40. Nous avons ainsi été amenés tout d'abord à croire que l'antigène somatique de *S. bukavu* devait être O : 49, étant donné que les germes du groupe sérologique « S » ne possèdent pas cet antigène. P. R. Edwards, que nous tenons à remercier de son obligeance, a attiré l'attention sur ce qui était une erreur (*vide infra*).

Nous avons alors entrepris des recherches plus approfondies et en avons consigné les résultats dans le tableau I. Il ressort de ces données que les antigènes somatiques de *S. bukavu* sont identiques à ceux de *S. johannesburg*, que ces deux sérotypes possèdent, en plus de l'antigène O : 40, un facteur qui n'est pas présent chez *S. bulawayo* et que, d'autre part, cette dernière possède également un facteur qui est absent chez *S. bukavu* et *S. johannesburg*.

TABLEAU I. — L'antigène somatique de *Salmonella bukavu*.

Sérums	Antigènes		
	<i>S. bulawayo</i>	<i>S. johannesburg</i>	<i>S. bukavu</i>
<i>S. bulawayo</i>			
non-absorbé	3.200	3.200	3.200
absorbé par			
<i>S. johannesburg</i>	400	-	-
<i>S. bukavu</i>	400	-	-
<i>S. johannesburg</i>			
non-absorbé	800	3.200	3.200
absorbé par			
<i>S. bulawayo</i>	-	1.600	1.600
<i>S. bukavu</i>	-	-	-
<i>S. bukavu</i>			
non-absorbé	3.200	3.200	3.200
absorbé par			
<i>S. bulawayo</i>	-	400	400
<i>S. johannesburg</i>	-	-	-

Mais l'antigène somatique majeur de ces trois *Salmonellae* est bien O : 40 et il convient dès lors d'écrire la formule antigénique de *S. bulawayo* = 1,40 : z : 1,5 et non pas = (1),49 : z : 1,5. En fait, nous nous rallions ici à l'opinion unanime des D<sup>rs</sup> Edwards, Taylor et Kauffmann (comm. pers.).

L'antigène somatique de *S. bukavu* étant le même que celui de *S. johannesburg*, il s'écrit évidemment : 1,40.

L'antigène flagellaire de la phase-1 est identique à celui de *S. javiana* (=  $l, z_{28}$ ). Ceci ressort de réactions d'agglutination avant et après absorptions croisées des sérums que nous avons préparés à l'aide de l'antigène flagellaire « spécifique » de ces deux sérotypes.

L'antigène de la phase flagellaire-2 est agglutiné par un sérum non-absorbé anti-H : 1, 2, 5, 6, 7 et par le sérum anti-H : 5 pur.

La structure antigénique de *S. bukavu* est donc = 1,40 :  $l, z_{28}$  : 1,5.

Nous tenons à remercier le professeur Kauffmann, Directeur du Centre International des Salmonellae à Copenhague, d'avoir bien voulu contrôler ce nouveau sérotype et nous faire part de ses avis et conseils.

RÉSUMÉ. — Description d'une nouvelle *Salmonella* isolée par copro-culture chez une femme indigène du Congo belge : *S. bukavu* = 1,40 : 1,28 : 1,5.

#### SUMMARY

The description is given of a new *Salmonella* serotype isolated from a native woman of the Belgian Congo : *S. bukavu* = 1,40 : 1,28 : 1,5.

#### BIBLIOGRAPHIE

KAUFFMANN (F.) et DEOM (J.). *Acta path. microb. scand.*, 1957, 40, 347.

### RECHERCHES SUR L'ANTAGONISME D'UNE PART, ET LE RENFORCEMENT D'ACTIVITÉ D'AUTRE PART DE QUELQUES ANTIBIOTIQUES COMBINÉS PAR PAIRES

par H. J. OSKAM et M<sup>lle</sup> A. KOELMAN.

(Laboratoire de Bactériologie  
de la Clinique Médicale de l'Université d'Utrecht)  
(Présenté par M. VAN DEINSE).

Le problème de l'interférence des antibiotiques, appliqués en combinaisons, est à l'ordre du jour. Non seulement les résultats changent avec les méthodes d'investigation, mais la discussion sur l'existence de synergie ou d'antagonisme entre deux antibiotiques est rendue difficile par l'imprécision des définitions. Dernièrement, Garrett [2], en passant en revue les différentes possibilités, vient d'augmenter encore l'imbroglio en proposant un nouveau classement des notions.

En 1956, Chabbert [1] a décrit l'antagonisme existant entre l'érythromycine et la spiramycine quant à leur action sur des staphylocoques résistants à l'érythromycine et sensibles à la spiramycine. A la suite de notre description [4] d'une technique permettant d'obtenir le renforcement réciproque d'activité de la combinaison érythromycine-tétracycline, M. Chabbert a bien voulu mettre à notre disposition un certain nombre de ses souches, pour que nous puissions les examiner selon notre technique.

Entre temps, nous avons développé une méthode plus exacte pour déterminer les concentrations équivalentes des diverses antibio-

tiques [5], permettant d'exprimer par un seul nombre le rendement de croissance des bactéries dans une culture. Ce *rendement relatif* est obtenu par addition des pourcentages d'absorption de la lumière par la culture après 2,5, 5, 7,5 et 24 heures d'incubation.

A l'aide de ce rendement relatif, indiqué par  $\Sigma a$ , nous calculons

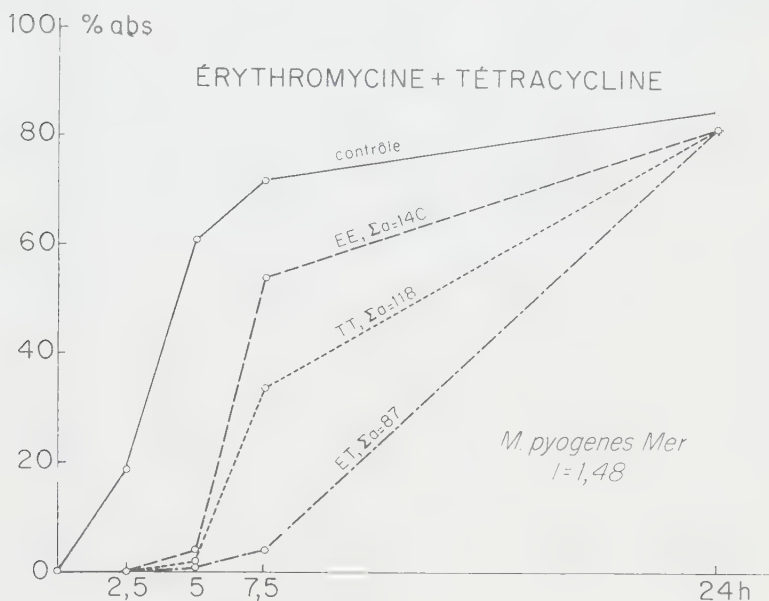


FIG. 1. — Effet de la combinaison érythromycine + tétracycline.  $I = 1,48$ .

l'*indice d'interférence*, indiqué par la lettre  $I$ . Cet indice exprime la relation existant entre le rendement moyen, obtenu en présence de 2 unités retardatrices des antibiotiques isolés, et celui obtenu en présence de la combinaison de 1 unité de chacun d'entre eux. La formule suivante exprime cette relation :

$$I = \frac{\frac{\Sigma a}{XX} + \frac{\Sigma a}{YY}}{\frac{2\Sigma a}{XY}}$$

X et Y représentant les unités retardatrices des substances X et Y.

Quand il s'agit d'une simple addition des effets d'antibiotiques combinés, on s'attendra à ce que  $I = 1$  environ, qu'un antagonisme éventuel soit exprimé par  $I < 1$  et un renforcement par  $I > 1$ . Les deux figures illustrent la détermination de  $I$  pour deux combinaisons. Ces figures montrent en outre que l'interférence des antibiotiques ne peut être jugée uniquement d'après la croissance au bout de 24 heures d'incubation. C'est peut-être pour cette raison que Levitt et Hubble [3] et Wiesmann [6] n'ont pu confirmer nos résultats.

Le tableau présente les résultats obtenus par des combinaisons par paires de quatre antibiotiques : tétracycline [T], érythromycine [E], oléandomycine [O] et spiramycine [S] (1). Les chiffres sont aussi simples que surprenants. Ils confirment l'antagonisme ES et le renforcement d'activité dans le cas de ET. Les combinaisons OT et ST

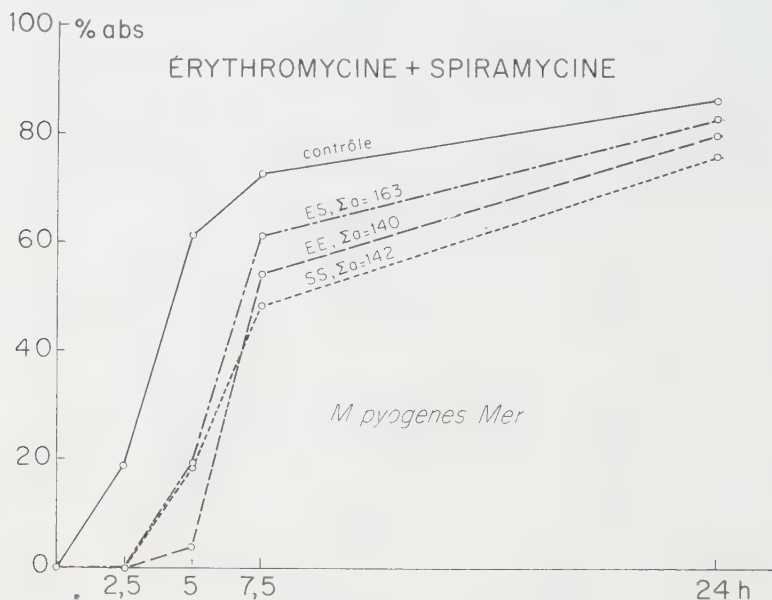


FIG. 2. — Effet de la combinaison érythromycine + spiramycine. I = 0,86.

TABEAU I. — Indices d'interférence (I) et unités de retardement ( $U_r$ ).

Souches de <i>M. pyogenes</i>	Combinaisons						$U_r$ en $\mu\text{g/ml}$			
	ET	OT	ST	EO	ES	OS	E	O	S	T
Ang (en triple)	1,33 1,23 1,26	1,57 1,65 1,40	1,55 1,53 1,50	0,90 0,78 0,75	0,76 0,71 0,79	0,91 0,97 0,97	0,25	0,45	1,37	23
P 211	1,34		1,22		0,83		2		5	0,03
Car	1,77	1,22	1,65	0,88	0,77	0,95	0,15	0,25	1	20
Mer	1,47	1,47	1,34	0,91	0,86	0,90	1	0,25	1	32
Kopj	1,41	1,30	1,25	0,81	0,85	0,96	0,25	0,25	0,4	25
Nahia	1,46	1,58	1,31	0,85	0,70	0,86	0,28	0,17	1	33
Cagli	1,30	1,18	1,23	1,03	0,91	0,91	0,07	0,25	1,34	27
Thier	1,13	0,98	1,24	0,96	0,95	0,97	0,65	5	5,3	0,06
Z 156	1,20	1,35	1,25	0,86	0,91	0,85	0,16	0,13	0,67	16

(1) La spiramycine nous a été aimablement fournie par Specia, sous le nom de Rovamycine ; l'oléandomycine (Romicil) par Hoffmann-La Roche ; l'érythromycine (Ilotycin) par la Maison Lilly. Nous les remercions de leur bienveillante collaboration.



ont un comportement analogue à celui de la combinaison ET ; celui des combinaisons EO et OS est peut-être analogue à celui de ES, mais cela est moins évident.

Pour les antibiotiques étudiés, l'interférence semble être pratiquement indépendante du degré de sensibilité individuelle des souches utilisées : cela ressort des valeurs des unités retardatrices différentes entre elles ( $U_r$ ).

CONCLUSION. — Nos résultats semblent corroborer l'opinion de Garrett [2], d'après laquelle des combinaisons standard, destinées à la vente au public, peuvent être choisies de telle façon que les avantages dépassent les inconvénients. Cela ne signifie nullement que la détermination de l'antibiogramme soit devenue inutile : elle garde toute sa valeur au contraire, car elle permet de faire un choix judicieux parmi les préparations proposées dans le commerce pharmaceutique.

RÉSUMÉ. — De nouvelles recherches ont confirmé l'existence d'un antagonisme entre érythromycine et spiramycine, et d'un renforcement d'activité entre érythromycine et tétracycline. Cette interférence se révèle indépendante de la sensibilité des souches étudiées.

## SUMMARY

### STUDIES ON ANTAGONISM AND POTENTIATION OF SOME ANTIBIOTICS ASSOCIATED BY PAIRS.

The existence of an antagonism *in vitro* between erythromycin and spiramycin and of potentiation between erythromycin and tetracyclin has been confirmed by a new series of experiments. It seems, that the interference does not depend on the sensitivities of the strains tested.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHABBERT (Y.) et HERVÉ (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 787.
  - [2] GARRETT (E. R.). *Antib. Chemoth.*, 1958, **8**, 8.
  - [3] LEVITT (R. O.) et HUBBLE (R. H.). *New Eng. J. Med.*, 1957, **257**, 180.
  - [4] OSKAM (H. J.), KOELMAN (A.) et SCHEE-JANSEN (M. v. d.). *Acta med. scand.*, 1956, **155**, 335.
  - [5] OSKAM (H. J.) et KOELMAN (A.). *Nature*, 1959 (*sous presse*).
  - [6] WIESMANN (E.). *Schweiz. med. Wschr.*, 1957, **87**, 1045.
-

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VIRUS DE COXSACKIE ÉVOLUTION DES LÉSIONS CHEZ LE SOURICEAU

par R. CAMAIN et P. BRES.

(Institut Pasteur de l'A. O. F., Dakar)

Lors de l'isolement de souches de virus de Coxsackie A [1] par inoculation aux souriceaux nouveau-nés, la régularité quasi chronométrique de l'ordre d'apparition des localisations musculaires du virus et de leurs symptômes est un fait remarquable. Il semble que le virus se comporte comme s'il obéissait à un tropisme musculaire singulièrement électif.

Nous avons donc tenté de suivre l'ordre d'apparition des lésions de myosite dans les différents groupes musculaires en pratiquant un examen anatomo-pathologique des souriceaux inoculés par voie intracérébrale ou par voie intrapéritonéale et sacrifiés de douze en douze heures après l'inoculation.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — L'inoculation a été effectuée chez des souriceaux âgés de 48 heures. Johnsson [2] rapporte que les symptômes caractéristiques chez les souriceaux apparaissent de trois à six jours après l'inoculation pour les souches A. L'évolution mortelle des paralysies a été beaucoup plus rapide chez nos souriceaux, mais peut-être s'agit-il d'une sensibilité particulière de notre élevage.

La souche de virus inoculée, souche KO (deuxième passage), appartient au groupe A type 6 (1) et a été isolée à Dakar en 1957. L'inoculum est constitué par une suspension dans 2 ml d'eau physiologique d'un cerveau de souriceau servant à l'entretien de la souche. Le souriceau est sacrifié au stade paralytique et le cerveau est conservé à  $-20^{\circ}$ . L'inoculation des souriceaux est faite à la dose de 0,05 ml par voie intrapéritonéale ou 0,01 ml par voie intracérébrale.

**RÉSULTATS.** — *Aspect clinique* : Douze et vingt-quatre heures après l'inoculation, il n'y a rien à signaler qui soit apparent. A la trente-sixième heure, alors qu'il ne se passe rien pour les souriceaux inoculés par voie intracérébrale, les premiers symptômes de paralysie se manifestent pour ceux inoculés par voie intrapéritonéale. Nous avons toujours vu la paralysie débiter de la même façon. Il s'agit d'abord d'une parésie frappant un seul des deux membres postérieurs : celui-ci a tendance à rester en extension et quand le souriceau veut se déplacer, la force segmentaire du membre opposé étant encore normale, il effectue un mouvement giratoire. A la quarante-huitième heure, l'affaïssissement du train postérieur qui s'ébauchait déjà est devenu net. Les tentatives de mouvements encore observées sont incapables de

(1) Identification due à l'obligeance du professeur Dalldorf à qui nous adressons nos remerciements.

soulever la ceinture pelvienne. Les pattes postérieures s'immobilisent indifféremment en flexion ou en extension. A la soixantième heure, le souriceau gît, inerte, présentant souvent des signes de cyanose.

Les souriceaux inoculés par voie intracérébrale présentent toujours un retard de douze heures pour l'apparition des mêmes symptômes.

*Aspect histopathologique* : Si l'on tente de faire la synthèse de l'ensemble des constatations histopathologiques, on aboutit aux conclusions suivantes :

1° Les lésions histopathologiques vont sensiblement de pair avec les signes cliniques et, aussi bien pour les souriceaux inoculés par voie intracérébrale ou intrapéritonéale, on ne décèle aucune altération dans les prélèvements de la douzième et de la vingt-quatrième heure.

2° De même que sur le plan clinique, il s'avère exister un léger décalage dans l'apparition des lésions histopathologiques entre souriceaux inoculés par voie intracérébrale et souriceaux inoculés par voie intrapéritonéale : pour les premiers, les lésions apparaissent à la quarante-huitième heure, tandis que pour les seconds ces mêmes lésions seront trouvées à la trente-sixième heure.

3° Compte tenu de la remarque précédente, et si l'on désigne par « T » (2) l'époque d'apparition des premières lésions, on aboutit aux constatations suivantes :

Alors qu'au temps T — 12 h, aucun signe prémonitoire valable ne pouvait être retenu, au temps T vont apparaître assez brutalement :

a) Un énorme œdème interstitiel au niveau des muscles de la ceinture pelvienne et plus spécialement sur les muscles qui prennent leur insertion sur la face antérieure et antéro-externe du trochanter et sur la branche ilio-pubienne. A peu près simultanément, cet œdème apparaît dans les muscles de la loge antérieure de la cuisse et dans le *psaos*.

b) En même temps que cet œdème s'observent des lésions musculaires très sévères et qui consistent en une hypotrophie ou une atrophie des fibres striées des groupes musculaires plus haut cités ; certaines de ces fibres perdent leur striation et font une dégénérescence hyaline. Dans certaines fibres également on peut saisir des images de caryorrhexis. Il convient de noter que les lésions peuvent être plus accusées sur un hémibassin que sur l'autre.

c) Les lésions viscérales sont très discrètes, varient d'un sujet à l'autre et consistent en un infiltrat pulmonaire interstitiel lympho-histiocytaire plus ou moins important.

Au temps T + 12, on va observer :

a) Au niveau des groupes musculaires déjà atteints au temps T, une diminution de l'œdème et l'apparition d'un infiltrat interstitiel important de nature essentiellement lympho-histiomonocytaire ;

b) Une aggravation des lésions musculaires, et on peut saisir dans certaines fibres altérées des tentatives de régénérescence (mise en état histiocytaire de la fibre) avec plurinucléation très marquée de cette dernière ;

(2) T se situe vers la trente-sixième heure pour la série inoculée par voie intrapéritonéale et vers la quarante-huitième heure pour la série inoculée par voie intracérébrale.

c) Simultanément, l'apparition des lésions d'autres groupes musculaires : ceux des muscles de la ceinture pelvienne qui n'étaient pas atteints, les muscles jambiers (atteinte discrète), les muscles de la ceinture scapulaire (l'atteinte de ces derniers pouvant être constatée seulement au temps  $T + 24$  h).

d) Les signes viscéraux se résument toujours à une broncho-pneumonie interstitielle plus ou moins marquée.

*Au temps  $T + 24$  h :*

a) Les atteintes musculaires vont porter, mais de manière inconstante, sur de nouveaux groupes : intercostaux, muscles de la paroi abdominale, muscles des gouttières vertébrales, diaphragme (un cas seulement).

b) Au niveau des muscles premiers atteints, l'œdème a beaucoup diminué ; par contre, infiltrat et lésions dégénératives sont plus vifs.

c) Le myocarde présente de l'œdème interstitiel et on peut y saisir quelques rares coulées d'infiltrat lympho-histiocytaire.

d) Au niveau du poumon, on note des hémorragies alvéolaires contingentes, mais pouvant aller jusqu'à la constitution de véritables inondations hémorragiques pulmonaires.

Le temps  $T + 36$  h n'est pas toujours atteint et les lésions histologiques sont assez superposables à celles du temps  $T + 24$ .

Ces faits sont d'ordre positif, par contre on peut noter comme caractères négatifs :

1° L'absence d'altérations des muscles linguaux, laryngés, carpo-métacarpiens et tarso-métatarsiens, encore que ces deux groupes musculaires puissent être très tardivement touchés.

2° L'absence d'altérations (au moins histologiquement décelables) du foie, des reins, du pancréas (endocrine et exocrine), de l'intestin, des gonades, de la thyroïde, du thymus, de la rate, des tissus osseux, cartilagineux, et enfin et surtout de l'axe encéphalo-médullaire.

L'affection en cause ici se présente avant tout comme une myopathie avec atteinte précoce des muscles de la ceinture pelvienne et des cuisses, se généralisant par la suite et s'accompagnant d'une fréquente atteinte pulmonaire.

CONCLUSIONS. — Chez les souriceaux de 48 h inoculés avec une souche de Cocksackie du groupe A, les examens anatomo-pathologiques sérieux à intervalles réguliers montrent que les muscles atteints sont le siège d'un œdème interstitiel d'apparition assez brutale qui ensuite diminue notablement alors qu'apparaissent une infiltration inflammatoire et des lésions dégénératives. Les lésions musculaires sont d'abord localisées aux muscles de la ceinture pelvienne puis progressent vers l'extrémité céphalique, intéressant tour à tour les muscles de la paroi abdominale, des gouttières vertébrales, des espaces intercostaux et atteignant enfin la ceinture scapulaire. Des lésions pulmonaires et parfois myocardiques surviennent ensuite, annonçant le stade terminal.

On ne peut manquer d'être frappé par la similitude que présentent tous les souriceaux dans la régularité de l'ordre d'apparition des atteintes musculaires.



## SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF COXSACKIE VIRUS.  
EVOLUTION OF THE LESIONS IN SUCKLING MICE.

Forty-eight hours old suckling mice are inoculated with a Cocksackie A virus strain. Serial histopathological studies, carried out at constant intervals, show in the diseased muscles an interstitial oedema, appearing rather suddenly and then significantly decreasing; at the same time, an inflammatory infiltration and degenerative lesions appear. The lesions are first localized in the pelvic muscles; they reach the abdominal, the vertebral, the intercostal spaces muscles, and at last, the scapular muscles.

Then pulmonar and sometimes myocardial lesions appear, preceding the death of the animal.

In all the suckling mice studied, the muscular lesions always appear following the same order.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRES (P.), CAMAIN (R.) et coll. *Bull. Méd. A. O. F.*, 1958, 3, 222.  
[2] JOHNSON (T.). *Meddel Stat. Bakt. Lab. Stockholm*, 1954-1955, 21, 5.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Propriétés biochimiques des germes coliformes hémolytiques isolés au cours du syndrome entéro-toxique colibacillaire du porcelet**, par CL. QUINCHON, M. HENRY et M<sup>me</sup> G. HENRY.

**Action sur les tissus de la souris de certains vaccins préparés avec des souches de *Salmonella* pathogènes et non pathogènes pour cet animal**, par M<sup>me</sup> J. GRABAR.

**Etude sur l'antigène soluble du virus rabique**, par J. M. VILLEMOT et A. PROVOST.

**Mammite staphylococcique de la brebis et vaccination locale**, par J. PILLET, O. GIRARD, H. DUTHEIL et B. ORTA.

**Réactions de fixation du complément chez les sujets atteints de grippe asiatique et rôle de l'âge dans l'élaboration des anticorps réagissant avec différents antigènes du groupe A**, par R. SOHIER, J. THIVOLLET, J. FREYDIER et F. CHALLUT-THAL.

**Dualité de la réaction cellulaire au cours de l'histoplasmose. Caractère histiocyttaire de l'histoplasmose à petites formes et caractère géantocellulaire de l'histoplasmose à grandes formes**, par J.-C. LEVADITI, E. DROUHET, G. SEGRETAINE et F. MARIAT.

**Solubilisation de phosphates naturels par les germes du sol**, par A. ROCHE et H. DE BARJAC.



# JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY

Contents of Volume 20, No. 1, February 1959.

- KRISS, A.E. and MITZKEVICH, I. N. *Krassilnikoviae*: a new class of micro-organisms found in sea and ocean depths.
- MENNA, M. E. di. Some physiological characters of yeasts from soils and allied habitats.
- KOCKOVA-KRATOCHVÍLOVÁ, A. and SVOBODOVÁ-POLÁKOVÁ, Y. *Nadsonia slovaca* nov. sp.—isolated in Slovakia.
- CHRISTIAN, J. H. B. and INGRAM, M. The freezing points of bacterial cells in relation to Halophilism.
- CHRISTIAN, J. H. B. and INGRAM, M. Lysis of *Vibrio costicolus* by osmotic shock.
- EBERHART, B. M. and TATUM, E. L. A gene modifying the thiamine-requirement of strains of *Neurospora crassa*.
- OLITZKI, A. L. and GODINGER, D. Investigation on streptomycin inhibitors with the aid of a streptomycin-dependent *Vibrio comma*.
- CARTWRIGHT, S. F. and THORNE, H. V. Some applications of detergents to the study of the virus of foot-and-mouth disease.
- SHAH, P. C. and KING, H. K. Amino acid requirements for formation of ine reductive amination system in *Bacillus subtilis*.
- BISSET, K. A. Some characters of *Rhizobium* strains from tropical legumes.
- DOREY, M. J. Some properties of a pectolytic soil *Flavobacterium*.
- WILDY, P., STOKER, M. G. P. and ROSS, R. W. Release of herpes virus from solitary HeLa cells.
- CADMAN, C. H. Some properties of an inhibitor of virus infection from leaves of raspberry.
- GORDON, R. E. and MIHM, J. M. A comparison of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*.
- SPICER, C. C. and DATTA, N. Reversion of transduced antigenic characters in *Salmonella typhimurium*.
- CLARKE, P. H. and MEADOW, P. M. Evidence for the occurrence of permeases for tricarboxylic acid cycle intermediates in *Pseudomonas aeruginosa*.
- CLARKE, P. H., GLOVER, P. and MATHIAS, A. P. The occurrence of polyol derivatives of cytidine diphosphate in micro-organisms.
- WIAME, J. M., HARPIGNY, R. and DOTHEY, R. G. A new type of *Acetobacter*: *Acetobacter acidophilum* (provisional species).

The subscription rate is 90s. net per volume of 3 parts,

Single parts 35s. each, plus postage.

Two volumes will be issued each year. Orders should be sent to

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS  
BENTLEY HOUSE 200 EUSTON ROAD, LONDON. N.W. 1

Printed in France.

Le gérant : G. MASSON.

Dépôt légal. — 1959. — 1er trimestre. — Numéro d'ordre 3245. — Masson et Cie, édit., Paris.  
Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 4, rue Cassette, Paris.